

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
ESCUELA DE POSGRADO

DIVISIÓN DE EDUCACIÓN

PROGRAMA DE POSGRADO

Efectos de la sombra de cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) en el cultivo del café (*Coffea arabica*) sobre los procesos de esporulación, dispersión a través del agua y deposición de *Hemileia vastatrix*, en Turrialba, Costa Rica

Tesis sometida a consideración de la División de Educación y el Programa de Posgrado como requisito para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

en Agroforestería y Agricultura Sostenible

Marta Beatriz Segura Escobar

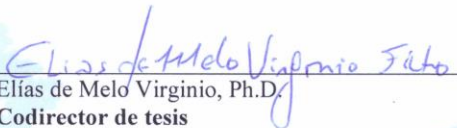

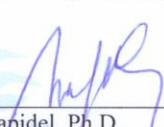
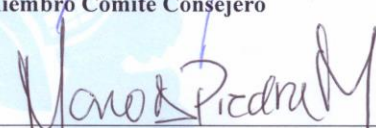
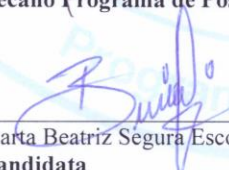
Turrialba, Costa Rica

2017

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y el Programa de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el grado de

**MAGISTER SCIENTIAE EN AGROFORESTERIA Y AGRICULTURA SOSTENIBLE**

**FIRMANTES:**

  
\_\_\_\_\_  
Jacques Avelino, Ph.D.  
**Codirector de tesis**  
\_\_\_\_\_  
Elías de Melo Virgilio Fato  
Elías de Melo Virgilio, Ph.D.  
**Codirector de tesis**  
\_\_\_\_\_  
Fernando Casanoves, Ph.D.  
**Miembro Comité Consejero**  
\_\_\_\_\_  
Bruno Rapidel, Ph.D.  
**Miembro Comité Consejero**  
\_\_\_\_\_  
Mario A. Piedra Marín, Ph.D.  
**Decano Programa de Posgrado**  
\_\_\_\_\_  
Marta Beatriz Segura Escobar  
**Candidata**

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la oportunidad de obtener mis estudios de maestría, por escuchar mis oraciones y por cumplir sus promesas en mi vida.

A mi madre Alba Armida Escobar y mi padre José Ricardo Segura por todo su apoyo, su amor, por darme las alas para volar y motivarme siempre a seguir adelante con cada uno de mis propósitos.

A mis hermanos Carlos Andrés Segura y Laura Esmeralda Segura por sus consejos, su compañía, sus palabras de ánimos y siempre acompañarme en cada una de mis decisiones.

A mis abuelos Marta Laura Escobar y Ricardo Arnulfo Segura que con su amor y oraciones me acompañan siempre y mis ángeles desde el cielo abuelita Mary y abuelito Cruz.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las obras maravillosas que ha hecho en mi vida, por todo lo que me ha dado, mucho más de lo que pude imaginar.

A la Fundación Henry A. Wallace y al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) por la oportunidad que me brindaron para realizar mi maestría por medio del financiamiento de mis estudios.

Al Programa GDA de USAID, Texas A&M Borlaug Institute y World Coffee Research por el apoyo recibido para la realización de este proyecto de investigación, el cual se enmarca dentro de los objetivos de este programa y las necesidades de la industria cafetalera de la región.

A mi asesor Jacques Avelino por su dedicación y apoyo durante la investigación, por sus consejos que me hacen ser una mejor profesional y una mejor persona. Infinitas gracias Dr., que Dios le permita continuar con esta noble labor de la enseñanza.

A mi asesor Dr. Fernando Casanoves por su apoyo incondicional, por su orientación, paciencia y entusiasmo para con esta investigación.

A mis asesores Elías de Melo Virginio y Bruno Rapidel, por su apoyo y consejos durante el proceso de investigación; gracias infinitas por sus recomendaciones y por su disposición siempre que la necesitaba.

Al equipo de estadística Sergio Vílchez y Eduardo Corrales, por su apoyo y aporte a los análisis de la investigación.

Al laboratorio de Fitoprotección del CATIE y a los doctores Eduardo Hidalgo y Gerardo García, por todo su apoyo y orientación durante la investigación.

A Karla Sánchez Aguilar por toda su ayuda durante el trabajo de laboratorio. Sin duda alguna esto es parte de tu trabajo también Karlita. Asimismo por brindarme su amistad durante mi permanencia en Costa Rica. De igual manera, gracias a Hugo por todo su apoyo en campo, sus buenas pláticas y toda su disposición con esta investigación y a Luis Araya y Luis Romero por su colaboración.

A Julia Badaroux, por su apoyo a nivel emocional y profesional; gracias Julia por su motivación. Llevo presente nuestros ratos de laboratorio de mucho trabajo y risas.

A Erika Hernández Hernández por todo tu apoyo incondicional, tus buenos consejos, tus risas que contagiaban cualquier momento difícil, gracias por compartir tanto conmigo durante estos dos años y por todo tu cariño.

A mis colegas y amigos especialmente a: Grace Cobos, Carolina Seas, Samuel Álvarez, Diego Saquicela, Mario Landívar, Aldo Flores, Héctor Rojas, Vanesa Ruenes, Luz Maria, Indira, Tut Si, Erika Hidalgo, Jennifer Cedeño y Namig Herrera quienes me acompañaron a lo largo de CATIE, de mi trabajo en el laboratorio y campo, por su motivación y buenos momentos compartidos durante estos dos años.

A todos los que amo y que desde lejos han estado pendiente de cada uno de mis logros, amigos y familia en general.

## CONTENIDO

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
1.1.1.	<i>Objetivo general .....</i>	<i>3</i>
1.1.2.	<i>Objetivos específicos .....</i>	<i>3</i>
1.1.3.	<i>Hipótesis de estudio.....</i>	<i>3</i>
<b>2.</b>	<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.</b>	<b>EL CAFÉ.....</b>	<b>4</b>
2.1.1.	<i>Origen.....</i>	<i>4</i>
2.1.2.	<i>Taxonomía.....</i>	<i>4</i>
2.1.3.	<i>Morfología y anatomía del café .....</i>	<i>4</i>
2.1.4.	<i>Ciclo de vida del café .....</i>	<i>5</i>
2.2.	<i>SISTEMÁTICA DE LA ROYA ANARANJADA DEL CAFÉ .....</i>	<i>5</i>
2.2.1.	<i>Biología .....</i>	<i>5</i>
2.2.2.	<i>Clasificación de las royas según el ciclo de vida.....</i>	<i>6</i>
2.3.	<i>CICLO PATOLÓGICO DE HEMILEIA VASTATRIX .....</i>	<i>8</i>
2.3.1.	<i>Estado libre del hongo .....</i>	<i>8</i>
2.3.1.	<i>Ciclo patológico: Relaciones tróficas entre en hongo y el café .....</i>	<i>8</i>
2.3.2.	<i>Ciclo de vida roya del trigo .....</i>	<i>9</i>
2.4.	<i>EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE LA ROYA DEL CAFÉ .....</i>	<i>10</i>
2.4.1.	<i>Inóculo inicial y residual .....</i>	<i>10</i>
2.4.2.	<i>Época de lluvia.....</i>	<i>11</i>
2.4.3.	<i>Temperatura y altitud.....</i>	<i>11</i>
2.4.5.	<i>Interacción de la sombra con plagas y enfermedades .....</i>	<i>12</i>
2.4.6.	<i>Relación de la sombra con la roya del café.....</i>	<i>14</i>
<b>3.</b>	<b>PRINCIPALES RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>PRINCIPALES CONCLUSIONES .....</b>	<b>16</b>
<b>5.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>17</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.</b>	<b>ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>23</b>
2.1.1.	<i>Características generales de la ubicación del ensayo .....</i>	<i>23</i>
2.1.3.	<i>Tratamientos de estudio .....</i>	<i>23</i>
2.3.	<i>Metodologías para objetivo 2. Conteo de uredosporas dispersadas por salpique .....</i>	<i>25</i>
2.4.	<i>Metodología para objetivo 3. Conteo de uredosporas pérdidas por lavado .....</i>	<i>25</i>
2.5.	<i>Metodología para objetivo 4. Conteo de uredosporas por deposición en la superficie de hojas de café .....</i>	<i>26</i>
2.6.	<i>METODOLOGÍA PARA LA TOMA DE DATOS DE MICROCLIMA.....</i>	<i>27</i>
2.11.	<i>Análisis estadístico de microclima y la energía cinética de las gotas de lluvia .....</i>	<i>30</i>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
3.1.	<i>CARACTERIZACIÓN CLIMÁTICA DEL ENSAYO Y DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO.....</i>	<i>31</i>

3.2.	RESULTADO DE LAS VARIABLES CLIMÁTICAS EN RELACIÓN CON ESPORULACIÓN E INTENSIDAD DE ESPORULACIÓN.....	31
3.3.	ESPORULACIÓN POR RAMA E INTENSIDAD DE ESPORULACIÓN .....	33
3.4.	DISPERSIÓN DE LAS UREDOSPORAS A TRAVÉS DEL LAVADO POR EL AGUA DE LLUVIA .....	36
3.5.	RESULTADO SOBRE DISPERSIÓN A TRAVÉS DEL SALPIQUE.....	38
3.6.	DEPOSICIÓN DE LAS ESPORAS DE ROYA SOBRE LAS HOJAS DE LA PLANTA DE CAFÉ .....	38
4.	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	39
	EFFECTO DE LA SOMBRA SOBRE LA ESPORULACIÓN E INTENSIDAD DE ESPORULACIÓN .....	40
5.	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	43
6.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	43
7.	<b>ANEXOS</b> .....	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del tallo de <i>Coffea arabica</i> . Fuente (Cannell 1985).....	5
Figura 2. Ciclo completo de la roya anaranjada del café. Fuente Agrios (2005).....	7
Figura 3. Ciclo completo de la roya del trigo. Fuente (Agrios 2005).....	10
Figura 4. Variables microclimáticas y climáticas medidas durante el período de febrero a septiembre del 2016 en el ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Línea de corte color verde en el eje horizontal representa 5 mm de lluvia. Líneas de corte del eje vertical color rojo representan el período seco de abril a mayo de 2016.....	32
Figura 5. Precipitaciones durante el 2015 y 2016 y el promedio calculado desde 1942 al 2016 en CATIE, Turrialba, Costa Rica .....	32
Figura 6. Energía cinética de las gotas de lluvia en las parcelas a pleno sol y bajo sombra densa de cashá en el ensayo agroforestal del CATIE, Turrialba, Costa Rica de mayo a agosto 2016.....	33
Figura 7. Esporulación total por rama durante el período marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra densa de cashá según el estrato de la rama muestreada en el ensayo agroforestal de café, CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC.p >0,05). Las líneas de corte color verde representan las aplicaciones del fungicida Cyprosol® para control de roya. La primera línea corresponde a la aplicación para los tres bloques, la segunda solamente para el bloque uno y dos debido a que en el bloque tres comenzó cosecha .....	34
Figura 8. Intensidad de esporulación por centímetro cuadrado durante el período marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y bajo sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC.p >0,05). Las líneas de corte color verde en la figura representa las aplicaciones con el fungicida Cyprosol® para control de roya. La primera línea corresponde a la aplicación para los tres bloques, la segunda solamente para el bloque uno y dos debido a que en el bloque tres comenzó cosecha. ....	35
Figura 9. Porcentaje de área promedio esporulada con <i>Lecanicillium lecanii</i> durante el período marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café, CATIE, Turrialba, Costa Rica. Las líneas de corte color verde en la figura representa las aplicaciones con el fungicida Cyprosol® para control de roya. La primera línea corresponde a la aplicación para los tres bloques, la segunda solamente para el bloque uno y dos debido a que en el bloque tres comenzó cosecha.....	36
Figura 10. Uredosporas recuperadas por lavado de la lluvia en dos posiciones (bajo el cafeto y en las entrecalles) en el período de marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC.p > 0,05). ....	37
Figura 11. Agua de lluvia recuperada por posición de los botes (calles y bajo plantas de café) y por tratamiento (sombra/sol) en el sistema agroforestal del CATIE, Turrialba, Costa Rica 2016. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC.p > 0,05).....	37

Figura 12. Uredosporas dispersadas por salpicadura en diferentes estratos del cafeto (alto, medio y bajo) en el período de marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y bajo sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café, Turrialba, CATIE, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC.p > 0,05). .....	38
Figura 13. Uredosporas recuperadas por deposición en tres estratos del café (alto, medio y bajo) en el período de marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra de cashá del ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC.p > 0,05). .....	39
Figura 14. Diagrama de flujos representando el ciclo de vida de <i>Hemileia vastatrix</i> . El círculo verde encierra los procesos estudiados en la presente investigación. ....	39



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efectos potenciales de la sombra sobre <i>H. vastatrix</i> a través de sus efectos sobre las vías de acción que afectan los diferentes procesos de la enfermedad (modificado de Avelino <i>et ál.</i> 2004). Fuente (Avelino y Rivas 2013).....	13
Cuadro 2. Promedio de temperatura (T°), humedad relativa (HR) y precipitación (mm) en los tratamientos pleno sol y sombra para los períodos de lluvia 1 y 2 y seco observados durante la investigación en el sistema agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica 2016. ....	31
Cuadro 3. Correlación de Pearson de la energía cinética (J/m <sup>2</sup> ) durante eventos de lluvia registrados a través del uso de splashcups con la suma de los cuadrados de las lluvias horarias de las 24 horas anteriores en el ensayo agroforestal del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	33
Cuadro 4. Promedios de esporulación por rama e intensidad de esporulación por estrato del cafeto muestreado en el sistema agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica 2016.....	35
Cuadro 5. Cuadro resumen de los efectos bajo los tratamientos de pleno sol y sombra en cada uno de los procesos del ciclo de la roya .....	42

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Croquis del ensayo (Ab= sombra densa cashá y pleno sol) agroforestal de café en CATIE, Turrialba, Costa Rica 2 016 .....	48
Anexo 2. Diagrama de la metodología utilizada para evaluar el número de esporas recuperadas a través del salpique de las gotas de lluvia. De izquierda a derecha en dirección de la flecha, se coloca el papel filtro dentro del tubo de centrifuga, luego se coloca agua con surfactante hasta 45 ml del tubo, se centrifuga durante 2 minutos a 2 500 rpm, se eliminan 35 ml de la superficie del tubo, pasa por el ultrasonificador durante cinco minutos y posteriormente se mezcla y se cuentan las uredosporas con el uso del microscopio y la cámara de Neubauer.....	48
Anexo 3. Calibración de la metodología utilizada para el conteo de uredosporas a través de salpique. Correlación entre el número de uredosporas por mililitro de agua inicial y el número de uredosporas recuperadas en laboratorio. ....	49
Anexo 4. Diagrama de metodología utilizada para evaluar el número de esporas recuperadas del lavado de uredosporas a través de la lluvia. De izquierda a derecha en dirección de las flechas: medición del volumen de la muestra, se le coloca surfactante, durante 5 minutos se coloca en el ultrasonificador, luego se vierte la muestra en tubos de centrifuga, posteriormente se centrifuga durante 3 minutos a 2 500 rpm, se eliminan 40 ml del volumen del tubo, se mezcla y finalmente se realiza el conteo de las uredosporas con el uso del microscopio y la cámara de Neubauer. ....	49
Anexo 5. Calibración de la metodología utilizada para el conteo de uredosporas a través del lavado. Correlación entre el número de uredosporas por mililitro de agua inicial y el número de uredosporas recuperadas en laboratorio. ....	50
Anexo 6.Trampas utilizadas para evaluar el salpique de las gotas de lluvia en las plantas de café en el ensayo agroforestal en CATIE, Turrialba, Costa Rica, 2 016.....	50
Anexo 7.Trampas utilizadas para evaluar el lavado de esporas a través de la lluvia en las plantas de café en el ensayo agroforestal en CATIE, Turrialba, Costa Rica, 2 016.....	51
Anexo 8. Trampas utilizadas para recuperar uredosporas depositadas sobre las hojas del café.....	51

## LISTA DE ACRÓNIMOS

AIC: criterio de información de Akaike

BIC: criterio de información bayesiano

cc: centímetro cúbico

cm: centímetro

EC: energía cinética

g: gramos

ha: hectáreas

HR: humedad relativa

J/m<sup>2</sup>: Joule por metro cuadrado

kg: kilogramos

L: litros

m: metros

ml: mililitro

mm: milímetro

msnm: metros sobre el nivel del mar

rpm: revoluciones por minuto

T°: temperatura

USAID: United States Agency for International Development

USDA: United States Department of Agriculture

## RESUMEN

La enfermedad de la roya anaranjada que se da en el café, es causada por el patógeno llamado *Hemileia vastatrix*. Este es un hongo que causa pérdidas económicas a este cultivo, como las producidas durante el ataque del 2011-12 en Centroamérica. Actualmente existen diferentes estrategias para minimizar el efecto que esta enfermedad tiene sobre el cultivo; una de ellas es el uso de la sombra, pero su efecto es controversial. Debido a ello, se investigó el efecto de la sombra sobre los procesos del ciclo de vida del patógeno aún no estudiados, como la esporulación, dispersión de las uredosporas a través del agua y deposición.

La investigación se realizó de enero a septiembre de 2016 en la finca del Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicada en Turrialba, Costa Rica, en el ensayo a largo plazo de sistemas agroforestales con café. Se trabajó en las parcelas bajo sombra de *C. eurycyclum* y pleno sol, distribuidas cada una en tres bloques (repeticiones). Las mediciones se hicieron cada dos semanas en un bloque a la vez. Se cuantificó la cantidad de uredosporas por  $\text{cm}^2$  y las producidas por rama a través de muestreos de hojas enfermas y estimaciones del área afectada con Image J. El número de uredosporas por  $\text{cm}^2$  perdidas por el lavado de la lluvia se midió en el agua colectada en recipientes ubicados bajo las plantas de café y las entrecalles. El número de uredosporas dispersadas por  $\text{cm}^2$  a través del salpique se calculó con el uso de platos Petri invertidos con papel filtro. La deposición por  $\text{cm}^2$  de hoja se obtuvo aplicandoacrílico sobre el haz y envés de las hojas. Los datos fueron analizados con modelos lineales generalizados y mixtos y con modelos lineales generales y mixtos.

La esporulación por rama fue mayor bajo condiciones de sombra en interacción con la posición de la rama (estrato medio más infeccioso) y las fechas de muestreo con un máximo de 326 903 uredosporas/rama. La intensidad de esporulación fue mayor bajo condiciones de sombra (41 160 uredosporas/ $\text{cm}^2$  en promedio), que a pleno sol (30 798 uredosporas/ $\text{cm}^2$ ). El proceso de dispersión a través del salpique de las gotas de lluvia en interacción con el estrato del café mostró diferencias; siendo mayor en los estratos bajo y alto en condiciones de pleno sol (promedio de 3,3 uredosporas/ $\text{cm}^2$  en ambas condiciones) y en el estrato medio del cafeto en condiciones de sombra (promedio de 2,6 uredosporas/ $\text{cm}^2$ ). El lavado de uredosporas fue mayor a pleno sol con un 33% del *stock* de inóculo presente que bajo sombra de cashá con 8%. El efecto de la sombra sobre la deposición de uredosporas de roya no fue significativo ( $p=0,3746$ ). Sin embargo, la interacción del estrato del cafeto y el lado de la hoja (haz/envés) fue significativa y fue mayor en el estrato bajo del café (aproximadamente 1 uredospora/ $\text{cm}^2$ ).

Los resultados de la investigación demuestran que la sombra favorece la conservación de las esporas y la intensidad de esporulación, lo cual da elementos importantes para buscar rasgos de las plantas utilizadas como sombra que reduzcan los efectos negativos ocasionados por la misma. El menor lavado de las esporas está posiblemente relacionado con (i) la intercepción del agua de lluvia por el dosel y (ii) el incremento del tamaño de las gotas de agua que atraviesan el dosel y de su energía cinética. Ambos puntos contribuyen a reducir la intercepción del agua por los cafetos. Árboles de menor altura y fácilmente manejables, de hojas pequeñas, recortadas y flexibles serían ideales para permitir un mayor lavado de las esporas. La sombra muestra un efecto claro sobre los procesos de esporulación y la dispersión a través del lavado por lluvia, pero el efecto de la sombra sobre los procesos de dispersión por salpique y la deposición siguen teniendo efectos inconclusos. Esto motiva el seguimiento de la investigación sobre estos procesos.

## ABSTRACT

The disease of orange rust that takes place in coffee, is caused by the pathogen called *Hemileia vastatrix*. This is a fungus that causes economic losses, such as observed during the attack in Central America in 2011-12. Currently there are different strategies to minimize the effect of this disease; one of them is the use of shade on the plantation, but its effect is controversial. And because of this, we investigated the effect of shade on pathogen life cycle processes not yet studied, such as sporulation, dispersion of uredospores through water and deposition.

The research was made from January to September in 2016 at the farm of the Agronomic Research and Teaching Center (CATIE), located in Turrialba, Costa Rica, in the long-term trial of agroforestry systems with coffee. We worked on the plots under shade of *C. eurycyclum* and full sun, each distributed in three blocks. Measurements were taken every two weeks in one block at a time. The amount of uredospores per cm<sup>2</sup> and those produced per branch were quantified through diseased leaf samples and estimates of the affected area with Image J. The number of uredospores per cm<sup>2</sup> lost by rain washing was measured in the water collected in containers located under the coffee plants and on the middle roads. The number of uredospores dispersed per cm<sup>2</sup> through the splashing, was calculated with the use of inverted petri dishes with filter paper. The deposition per cm<sup>2</sup> of sheet was obtained by applying acrylic on the leaf's curvature on the blade and underside of the leaves. The data were analyzed with generalized and mixed linear models and with general and mixed linear models.

Sporulation per branch was higher under shade conditions in interaction with branch position (mean stratum more infectious) and sampling dates with a maximum of 326,903 uredospores / branch. Sporulation intensity was higher under shade conditions (41,160 uredospores / cm<sup>2</sup> on average) than in full sun (30,798 uredospores / cm<sup>2</sup>). The dispersion process through the splashing of raindrops in interaction with the stratum of coffee showed differences; being higher in the low and high strata under full sun conditions (average of 3.3 uredospores / cm<sup>2</sup> in both conditions) and in the middle stratum of the coffee tree in shade conditions (average of 2.6 uredospores / cm<sup>2</sup>). The uredospores wash was higher in the full sun with 33% of the present inoculum stock than under shade of cashá with 8%. The effect of shade on the deposition of uredospores of rust was not significant ( $p = 0.3746$ ). However, the interaction of the coffee stratum and leaf side (bundle / back) was significant and was higher in the lower stratum of coffee (approximately 1 uredospora / cm<sup>2</sup>).

The results of the research show that shade may favor the conservation of spores and the intensity of sporulation, which gives important elements to look for plants characteristics that reduces the negative effect caused by the shade. Less washing of the spores might be related to (i) the interception of rainwater by the canopy and (ii) the increase in the size of the water droplets that pass through the canopy and its kinetic energy. Both points contribute to reduce the interception of water by coffee trees. Smaller trees, easily handled, with small, trimmed and flexible leaves would be ideal to allow a greater washing of the spores. Shade shows a clear effect on sporulation and dispersal processes through rain washing, but the effect of shade on the spattering and deposition processes continues to have inconclusive effects. This motivates the monitoring of research on these processes.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La roya anaranjada es un patógeno del cultivo del café que ataca principalmente a la especie *Coffea arabica*. Aunque su origen es africano, tuvo sus primeros ataques en la isla de Ceilán (ahora Sri Lanka) en Asia en 1869 (Avelino *et ál.* 1991). Fue nombrada por Berkeley con el nombre de *Hemileia vastatrix* en ese mismo año (Blanco 1984; Chalfoun y Zambolim 1985).

La roya anaranjada ha provocado pérdidas económicas importantes. Por ejemplo, Ceilán pasó de ser el tercer productor a nivel mundial de café a tener pérdidas del 95% en 1893 con respecto a las producciones de 1879 (Saccas 1971). La enfermedad se dispersó a partir de esta isla en toda Asia. En 1970, se dan los primeros reportes de roya en Brasil (McCook 2009), donde debido a la presencia de la enfermedad se tomaron diferentes medidas de control para erradicarla; sin embargo, estas no dieron resultados. A Centroamérica llegó en 1976; los primeros casos se reportaron en Nicaragua y luego se extendieron a toda la región. Durante más de tres décadas se logró convivir con la enfermedad gracias al uso de fungicidas de forma moderada, la implementación de técnicas para mejorar la productividad y la utilización reducida de variedades resistentes (Avelino *et ál.* 1999; Staples 2000; Avelino y Rivas 2013).

A partir del 2008, se observaron ataques de la enfermedad más intensos que los observados en los años anteriores. En Colombia, durante el período 2008-2011, el ataque de roya causó pérdidas del 30% en comparación con el año 2007. La epidemia más importante de la historia en la región Centroamericana y México se dio durante el 2012, causando pérdidas del 16% en relación con el período de 2011-2012 y de un 10-13% en el período 2013-2014 con respecto a la producción del 2012-2013. También se reportaron ataques importantes en Ecuador y Perú durante el 2013. (Avelino y Rivas 2013; ICAFE 2014; Avelino *et ál.* 2015). Esta crisis provocó pérdidas importantes desde el primer año de ataque. Durante el 2012, se observó un ataque precoz de la roya anaranjada y consecuentemente una muerte prematura de las bandolas, lo cual es poco usual, ya que el efecto de la roya sobre el café se observa el siguiente año de producción con respecto al ataque (Avelino y Rivas 2013).

Avelino *et ál.* (2015) atribuyen estos ataques a factores económicos y ambientales. Epidemias de fuerte intensidad han coincidido con la reducción del precio del café durante las epidemias de 1989-1990 en Costa Rica y 2002-2003 en El Salvador y la del 2012-2013 en Centroamérica. El alza del costo de los insumos ha sido asociada a las epidemias del 2008-2011 en el caso de Colombia. La poca rentabilidad del cultivo no permitió que se diera un manejo adecuado a las plantaciones de café, ocasionando así que las plantas fueran más expuestas a plagas y enfermedades (Avelino y Rivas 2013).

Otro factor importante que incide en la epidemia de la roya es el factor climático. En Centroamérica en 2012 se registró una reducción de la amplitud térmica diurna (Avelino *et ál.* 2015); es probable que estos cambios de temperatura redujeran el período de latencia de la enfermedad. Durante ese mismo año, se observaron también irregularidades en las condiciones de precipitación; la temporada de lluvia comenzó antes de lo normal en Centroamérica, lo que probablemente indujo la aparición temprana de la roya. Por el contrario, en la segunda mitad del año llovió menos, lo cual

benefició el desarrollo de la enfermedad, ya que lluvias menos frecuentes conducen a una mayor conservación de las uredosporas (Avelino *et ál.* 2015).

Aunque la epidemia del 2012 fue generalizada a nivel de Centroamérica, México, el Caribe y Colombia, los niveles alcanzados variaron según factores locales. Prácticas como el uso de fertilizantes, fungicidas, densidades de siembra, la variedad del café y el manejo de la sombra son algunos ejemplos (Avelino y Rivas 2013). Estudios han demostrado que las epidemias de roya son más intensas cuando el rendimiento del café es alto, probablemente debido a la translocación de compuestos fenólicos de hojas a frutos (Avelino *et ál.* 2015), que debilita la resistencia fisiológica de la planta. Esto es más frecuente en condiciones de pleno sol, ya que se logran mayores rendimientos. La exposición a pleno sol y el desarrollo de la enfermedad pueden ocasionar defoliaciones precoces (Avelino *et ál.* 2011; Avelino y Rivas 2013). La sombra permite contrarrestar este efecto; actualmente es una alternativa para enfrentarse al cambio climático porque ayuda a regular las temperaturas (Avelino *et ál.* 2015). Además, la sombra regula la carga fructífera y, consecuentemente, disminuye los niveles de roya (López-Bravo *et ál.* 2012).

Los efectos de la sombra sobre la roya siguen siendo controversiales y muestran todavía aspectos sin resolver. Algunos autores reportan que la sombra aumenta la incidencia de la roya (Staver *et ál.* 2001; López-Bravo *et ál.* 2012), mientras que otros encuentran que reduce la incidencia (Soto *et ál.* 2002). Estudios muestran que al disminuir la cantidad de luz que llega al café se favorece la germinación de las uredosporas (López-Bravo *et ál.* 2012). Como se mencionó anteriormente, la sombra disminuye la carga fructífera y por lo tanto aumenta la resistencia fisiológica del café a la roya (Avelino *et ál.* 2015). Avelino *et ál.* (2006), mencionan que la sombra proporciona condiciones de microclima que favorecen la germinación y penetración del hongo y favorece la presencia del hongo antagonico *Lecanicillium lecanii*, que parasita a las uredosporas de roya y contrarresta el ataque (Schroth *et ál.* 2000). Como se puede deducir, existen efectos opuestos de la sombra sobre diferentes procesos de la roya que posiblemente interactúan con el clima (Avelino *et ál.* 2015), por lo cual es difícil de establecer un balance.

Lo anterior indica que para entender bien el efecto de la sombra es necesario realizar investigaciones considerando los procesos del ciclo de vida de la roya. Por procesos se entienden las diferentes fases de la enfermedad: pre-infección (germinación hasta penetración), colonización, esporulación, dispersión y deposición.

El efecto de la sombra sobre el proceso de pre-infección se ha medido a través de la incidencia de la roya (porcentaje de hojas enfermas). La incidencia es un indicador del éxito de la infección, es decir, de que la germinación y penetración se hayan logrado (Avelino *et ál.* 2004; Pico 2014; Granados 2015). Pico (2014) indica que la sombra incrementa la incidencia de la enfermedad; sin embargo, la sombra también juega un papel importante en el proceso de dispersión. Boudrot *et ál.* (2016) observaron que la interacción entre la sombra y el clima es la que afecta la dispersión de uredosporas: cuando llueve, la sombra posiblemente incrementa la energía cinética de las gotas de agua y favorece la dispersión en el aire; sin embargo, en los días secos la sombra intercepta el viento y reduce la dispersión. Para los procesos de colonización, deposición, esporulación, dispersión en agua, el efecto de la sombra sigue siendo poco conocido (Avelino *et ál.* 2004).

Comprender el efecto de la sombra, en interacción con el clima, sobre cada uno de estos procesos ayudará a identificar los rasgos que la sombra debe de tener para limitar la roya en cada una de sus etapas. En esta investigación nos enfocamos en entender los efectos de la sombra sobre los procesos de esporulación, dispersión a través del agua y deposición de *H. vastatrix*.

## **1.1. Objetivos e hipótesis**

### **1.1.1. Objetivo general**

Determinar los efectos de la sombra de cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) sobre los procesos de esporulación, dispersión a través del agua y deposición de *Hemileia vastatrix* en el cultivo del café en la zona de Turrialba, Costa Rica.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar el microclima de la zona de estudio a pleno sol y bajo sombra densa de cashá (*Chloroleucon eurycyclum*)
- Evaluar el efecto de la sombra en el café sobre la esporulación de *Hemileia vastatrix* por rama y su intensidad por unidad de área
- Evaluar el efecto de la sombra en el café sobre la dispersión de *Hemileia vastatrix* a través del lavado de las hojas
- Evaluar el efecto de la sombra en el café sobre la dispersión de *Hemileia vastatrix* a través del salpique
- Evaluar el efecto de la sombra en el café sobre la deposición de *Hemileia vastatrix*

### **1.1.3. Hipótesis de estudio**

- Existe un efecto de la sombra sobre el microclima que puede explicar los efectos sobre la roya
- Existe un efecto de la sombra en el café sobre la esporulación de *Hemileia vastatrix* por rama y su intensidad por unidad de área
- Existe un efecto de la sombra en el café sobre el lavado de las hojas *Hemileia vastatrix*
- Existe un efecto de la sombra en el café sobre la dispersión de *Hemileia vastatrix* a través del salpique
- Existe un efecto de la sombra en el café sobre la deposición de *Hemileia vastatrix*.



## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. El café**

#### **2.1.1. Origen**

El café es originario de las montañas de Etiopía; sin embargo, fueron los árabes los primeros en cultivarlo y propagarlo cuando lo introdujeron a Yemen y Egipto. Alrededor de 1505, los árabes lo introducen a Ceilán (Blanco 1984). En 1690 se comienza a cultivar en la Isla de Java (Indonesia) (Rojo y Pérez 2014). El consumo del café se expandió por el cercano oriente y Turquía y en Europa después de los años 1600. El consumo sigue su expansión a Holanda, Alemania y Austria desde Turquía en 1683, y en Suecia y Dinamarca quienes tomaron el hábito del café de Alemania en 1756. Alrededor de 1714 los holandeses llevaron el cultivo del café a Surinam (Guyana Holandesa), pero no es sino hasta 1918 donde el café se cultiva con éxito en este país. En 1720 el cultivo se introduce a Martinica, las Antillas y posteriormente a Centroamérica (Blanco 1984).

#### **2.1.2. Taxonomía**

El café pertenece al grupo Fanerógamas, clase Angiosperma, subclase Dicotiledónea, orden Rubiales, familia Rubiaceae, género *Coffea*. Existen alrededor de 100 especies de este género; pero las más importantes son: *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. congensis*. Todas son autóctonas de África, de las islas del Océano Indico y de Madagascar (Blanco 1984; Alvarado y Rojas 1994; Rojo y Pérez 2014)

#### **2.1.3. Morfología y anatomía del café**

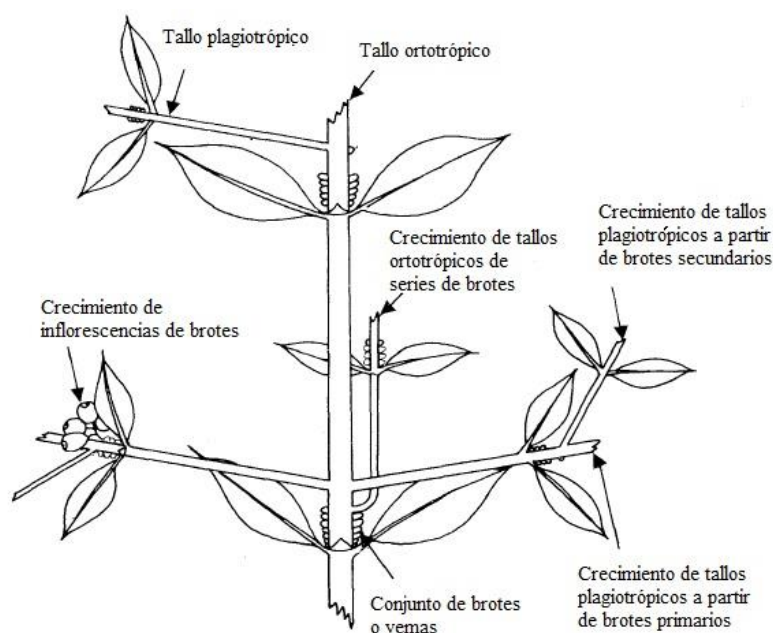
El café es un arbusto leñoso, puede alcanzar de 5 a 10 m de altura, presenta una raíz pivotante en sentido vertical y raíces secundarias en sentido horizontal. El tallo principal, ortótropo (vertical) forma bandolas oblicuas o primarias que producen hojas opuestas de dos en dos. De los nudos de las bandolas primarias nacen las bandolas secundarias o plagiótropas (horizontales) (Figura 1) y de estas las terciarias (Cannell 1985). Las bandolas primarias y secundarias producen flores y frutos.

Las flores del café nacen en los ángulos entre las hojas y las bandolas. Brotan entre tres o cuatro pedúnculos cortos que a su vez sostienen dos hojas pequeñas (brácteas) y entre ellas de tres a cuatro botones florales. En las axilas de cada hoja puede haber de 9-16 botones y generalmente no abren todos a la misma vez.

El fruto es una drupa (cereza) de forma ovoidea subglobosa, su color es rojo a la maduración, aunque, existen variedades de drupas amarillas (variedad catuai). El fruto mide de 10-15 mm de ancho y entre 16-18 mm de largo y está compuesto por dos semillas unidas por la parte plana de ambas, son de color gris amarillento o gris verdoso según las variedades. Las semillas miden 10 mm de longitud, 6-7 mm de ancho y 3-4 mm de espesor y el peso oscila entre 0,15-0,20 gr (Blanco 1984).

Las especies más importantes a nivel comercial son *C. arabica* y *C. canephora*. *C. arabica* fue descrita por Linneo en 1753; puede medir hasta 5 m de altura a diferencia de *C. canephora* que puede medir hasta 10 m. Las hojas de *C. arabica* son de color verde oscuro y ovaladas y brillantes, mientras que *C. canephora* presenta las hojas más largas. La flor de *C. arabica* es autógama (autofértil) a diferencia de *C. canephora* que es alógama (autoestéril). El fruto de *C. arabica* alcanza su tamaño

rápida, alrededor de las 12 semanas mide la mitad de su longitud final. *C. canephora* tarda de tres a cuatro meses para alcanzar la madurez y su tamaño. Las semillas de *C. arabica* son aplanadas mientras que las de *C. canephora* son alargadas y pequeñas. *C. arabica* se clasifica en variedades de porte alto y porte bajo; las variedades más conocidas de porte alto son: arábica (typica) y bourbon (Rojo 2014) y mundo novo (cruce de bourbon y sumatra). Las variedades de porte bajo son: caturra, catuai, catimor, entre otras. La variedad más conocida de *C. canephora* es robusta (Alvarado y Rojas 1994).



**Figura 1.** Morfología del tallo de *Coffea arabica*. Fuente (Cannell 1985)

#### 2.1.4. Ciclo de vida del café

El desarrollo de la planta en el tiempo comprende tres etapas importantes: crecimiento, producción y decadencia fisiológica. El crecimiento comprende desde la germinación de la planta hasta su etapa adulta, puede durar de 4-7 años según la especie. La etapa de producción va de los 15-25 años y durante este período, la planta se desarrolla a plenitud y alcanza máximas producciones. En las regiones lejanas a la línea ecuatorial, el desarrollo de la planta presenta un ciclo anual de floración y fructificación. El crecimiento de brotes es mayor durante la época de lluvias. La floración ocurre en la época seca y es estimulada por las primeras lluvias del año; los frutos inician su desarrollo durante la época seca y se cosechan terminando la época de lluvias (Cannell 1985). La decadencia fisiológica es cuando la planta disminuye sus niveles de producción que termina con su muerte (Blanco 1984).

### 2.2. Sistemática de la roya anaranjada del café

#### 2.2.1. Biología

La roya anaranjada del café es una enfermedad ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix*, clasificado como: Phylum: Basidiomycota; Clase: Urediniomycetes; Orden: Uredinales; Familia:

Chaoniaceae; Género: *Hemileia*; Especie: *vastatrix*. En una clasificación anterior se encontraba dentro de las Pucciniaceae (Avelino *et ál.* 1999; Avelino y Rivas 2013). Sin embargo, investigaciones han demostrado un parecido con *Maravalia cryptostegiae* que pertenece a la familia Chaoniaceae (Evans 1993).

Los hongos uredinales comprenden alrededor de 100 géneros y 7000 especies. *H. vastatrix* se encuentra dentro de este orden y ataca únicamente al género *Coffea*, en especial *C. arabica* (Kushalappa y Eskes 1989; Avelino *et ál.* 1999; Voegelé *et ál.* 2009). Tiene cerca de 50 especies de las cuales sólo *H. vastatrix* y *H. coffeicola* infectan al café (Avelino y Rivas 2013). Los uredinales son parásitos que se dividen según su forma de vida: biotróficos, necrotróficos y hemi-biotróficos (Glazebrook 2005; Voegelé *et ál.* 2009). Los hongos biotróficos son los que necesitan de su hospedero vivo para completar su ciclo. No pueden cultivarse *in vitro*, forman estructuras de reproducción bien diferenciadas y estructuras llamadas haustorios que penetran las células del hospedero; *Hemileia vastatrix* pertenece a este grupo. Los necrotróficos son hongos que se alimentan de células muertas de la planta, como por ejemplo *Botrytis cinerea*. Los hongos hemi-biotróficos son aquellos que tienen ambas etapas, normalmente al principio de la infección son biotróficos y luego pasan a ser necrotróficos (Glazebrook 2005); este es el caso de *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (Phillips-Mora *et ál.* 2006).

### **2.2.2. Clasificación de las royas según el ciclo de vida**

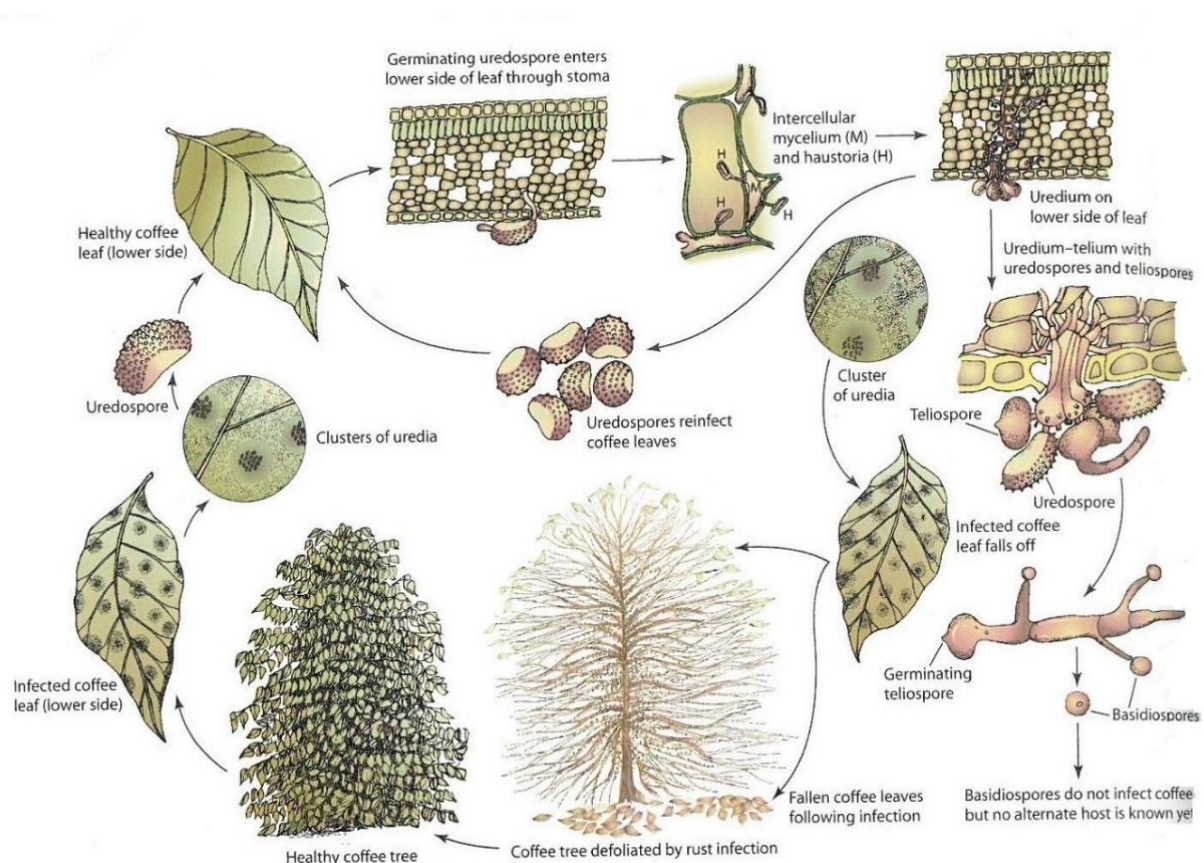
La mayoría de las royas tienen mecanismos de adaptación según su lugar de existencia (Figueiredo y Passador 2008). Estas se clasifican en macrocíclicas, demicíclicas y microcíclicas (Zuluaga *et ál.* 2008), según su número de estados de esporulación y fructificación. Las macrocíclicas son aquellas que tienen cinco estados: teliosporas, basidiosporas, espermacios, aecidiospora y uredospora. Las demicíclicas no presentan aecidiosporas o uredosporas. Las microcíclicas son especies que sólo presentan teliosporas, aunque algunas desarrollan espermogonios. Las royas macrocíclicas y demicíclicas necesitan de hospederos alternos para completar su ciclo; es decir que realizan la etapa de aecidiospora en una planta y la telial en otra (Zuluaga *et ál.* 2008). A este tipo de royas se les clasifica también como heteroicas; mientras que las royas que sólo necesitan un hospedero para completar su ciclo se denominan autoicas (Agrios 2005).

Existe otro tipo de clasificación del ciclo de vida de las royas, según su nivel de evolución: ciclo no expandido, no presenta telios y algunas veces solamente basidios (hospederos primitivos en la escala de evolución); ciclo parcialmente expandido, donde la teliosporas son acompañadas por uredosporas o aecidiosporas (hospederos ancestrales que se encuentran más en regiones del trópico bajo húmedo); ciclo completamente expandido, que presenta las cinco etapas; ciclo parcialmente reducido, que no tiene al menos un estado anamorfo generalmente la uredospora; y el ciclo reducido, donde hay formación de espermogonios y teliosporas (Zuluaga *et ál.* 2008).

La roya del café se conoce como una roya autoica, ya que sólo se le conoce una especie como hospedero. La clasificación según número de estructuras de fructificación genera controversia, ya que no pertenece a ninguno de los tipos de clasificación antes mencionados. Aunque se ha denominado como una roya microcíclica (Agrios 2005; Figueiredo y Passador 2008), posiblemente, con la clasificación según el nivel de evolución, podría pertenecer al grupo de ciclo parcialmente expandido (teliosporas acompañadas de uredosporas o aecidiosporas).

*H. vastatrix* presenta sólo la fase de uredosporas (Figura 2). Sin embargo, se ha encontrado evidencia de una fase sexual oculta que ocurre dentro de la uredospora (Rajendren 1967; Carvalho *et ál.* 2011). Inicialmente hay un crecimiento del micelio y luego se forman uredosporas. Es decir que existe una fase sexual dentro de una estructura asexual. A esto se le conoce como criptosexualidad y este fenómeno podría explicar el surgimiento de nuevas razas de *H. vastatrix* y su rápido desarrollo y evolución.

Se conoce que *H. vastatrix* ocasionalmente produce las fases teliospora y basidiospora (Agrios 2005); sin embargo, estas son vestigios de una forma ancestral del hongo (Coutinho *et ál.* 1993; Zuluaga *et ál.* 2008; Fernandes *et ál.* 2009); además no tienen viabilidad y no infectan el café (Agrios 2005; Avelino *et ál.* 2015). Esto señala una evolución de la roya haciendo que su ciclo sea más corto y simple. Las etapas de espermacios y aecidiosporas aún no se conocen (Kushalappa y Eskes 1989; Figueiredo y Passador 2008). En zonas templadas, las teliosporas de las royas pueden tener paredes gruesas, lo cual les permite sobrevivir a períodos de inviernos. Sin embargo, en zonas tropicales, *H. vastatrix*, las paredes no son tan gruesas (Figueiredo y Passador 2008).



**Figura 2.** Ciclo completo de la roya anaranjada del café. Fuente Agrios (2005)

## **2.3. Ciclo patológico de *Hemileia vastatrix***

### **2.3.1. Estado libre del hongo**

La dispersión es el movimiento de uredosporas a través del agua o viento hacia el hospedero. Para que la dispersión se lleve a cabo se necesita que las uredosporas estén maduras. La fase de dispersión está compuesta por tres etapas; la primera consiste en la liberación del inóculo del esporóforo (Fitt *et ál.* 1989; Avelino *et ál.* 2015), la segunda en su transporte a través del aire (Kushalappa y Eskes 1989) o del agua y la tercera ocurre cuando las uredosporas se depositan sobre una nueva hoja (Avelino y Rivas 2013). Según Savary y Janeau (1986), las precipitaciones están relacionadas a la dispersión de esporas a través del lavado del aire, salpique, escurrimiento de la planta y goteo. La deposición de las uredosporas se puede dar en el haz o envés de la hoja. Sin embargo, es en el envés de la hoja donde se da la penetración posteriormente por los estomas. Cuando las uredosporas quedan sobre el haz de la hoja, es posible que estas se dispersen nuevamente por mecanismos como el salpique y logren alcanzar el envés de una nueva hoja o se pierda por lavado (Kushalappa y Eskes 1989).

La etapa de germinación del hongo ocurre en presencia de agua libre (Kushalappa y Eskes 1989), y marca el inicio de la infección. La uredospora puede emitir hasta cuatro tubos germinativos en un período de 6-12 horas. Estos tubos crecen hasta encontrar los estomas de la hoja (Zuluaga *et ál.* 2008) y tienen un crecimiento más rápido a temperaturas de 19-22°C; al mismo tiempo, durante este proceso, el hongo necesita condiciones de humedad. Posteriormente se da paso a la formación de los apresorios que requieren temperaturas entre 13-16°C (De Jong *et ál.* 1987) para su desarrollo; estos se encargan de facilitar la etapa de penetración. La germinación de los tubos puede inhibirse por la luz y por la evaporación del agua de la hoja, ausencia de agua libre y baja humedad relativa (Kushalappa y Eskes 1989).

### **2.3.1. Ciclo patológico: Relaciones tróficas entre el hongo y el café**

Con la penetración se da paso a una relación trófica entre el hospedero y el hongo. Durante esta etapa la hifa germinada penetra a través del estoma de la hoja (Silva *et ál.* 2008; Zuluaga *et ál.* 2008; Avelino y Rivas 2013; Avelino *et ál.* 2015). Si posterior a la lluvia las temperaturas oscilan entre 17 y 23°C la penetración se ve favorecida (De Jong *et ál.* 1987) y, posteriormente, la colonización de la hoja por el hongo. En esta etapa hay un crecimiento intercelular del hongo. *Hemileia vastatrix* comienza a extraer nutrientes de la hoja con unas estructuras denominadas haustorios (Kushalappa y Eskes 1989; Zuluaga *et ál.* 2008) y aparecen las primeras lesiones amarillentas en la hoja. El tiempo desde la germinación del hongo hasta la aparición de las primeras lesiones se conoce como período de incubación (Kushalappa y Eskes 1989; Avelino *et ál.* 1999; Avelino y Rivas 2013; Barquero 2013).

El ciclo finaliza con la maduración del hongo y su esporulación. Se diferencian estructuras llamadas soros que son las encargadas de producir nuevas uredosporas. Los signos de las uredosporas maduras son manchas amarillas o anaranjadas con presencia de polvo fino amarillo (Kushalappa y Eskes 1989). No se conocen los factores que promueven la esporulación, aunque Kushalappa y Eskes (1989), reportan que la temperatura y humedad relativa están relacionadas con el proceso de esporulación. El tiempo entre germinación y esporulación se denomina período de latencia, el cual cuanto más corto, más intensa es la epidemia (Avelino *et ál.* 1999). Nuevas uredosporas pueden aparecer en el envés de la hoja en 10 o 25 días después de la germinación; generalmente, las hojas jóvenes son más afectadas que las hojas viejas.

La roya ocasiona caídas prematuras de las hojas ya que las pústulas no permiten procesos como fotosíntesis. Esto influye en la maduración del café y ocasiona bajos rendimientos y muerte de la bandola o rama.

Las uredosporas de *H. vastatrix* se producen en estructuras denominadas soros (Figueiredo y Passador 2008); estas uredosporas pueden estar en una fase madura e inmadura. Las uredosporas generalmente se ubican en el centro del soro (McCain y Hennen 1984), y no tienen vida prolongada por lo tanto se transmiten de las lesiones activas a hojas nuevas. La estructura de las uredosporas presenta una parte convexa equinulada y un lado plano; Las uredospora maduras tienen alrededor de 150-300 espinas las cuales están estrechamente agrupadas a lo largo de toda la uredospora y forman una cresta continua en la superficie de la misma (McCain y Hennen 1984). Las espinas sirven como anclaje en el tejido foliar (Zuluaga *et ál.* 2008). La parte ventral de los uredosporas es lisa. En promedio una lesión de 18 mm de diámetro puede tener alrededor de 50-150 mil estomas, contener alrededor de 15-50 mil soros y producir entre 300 mil-2 millones de uredosporas.

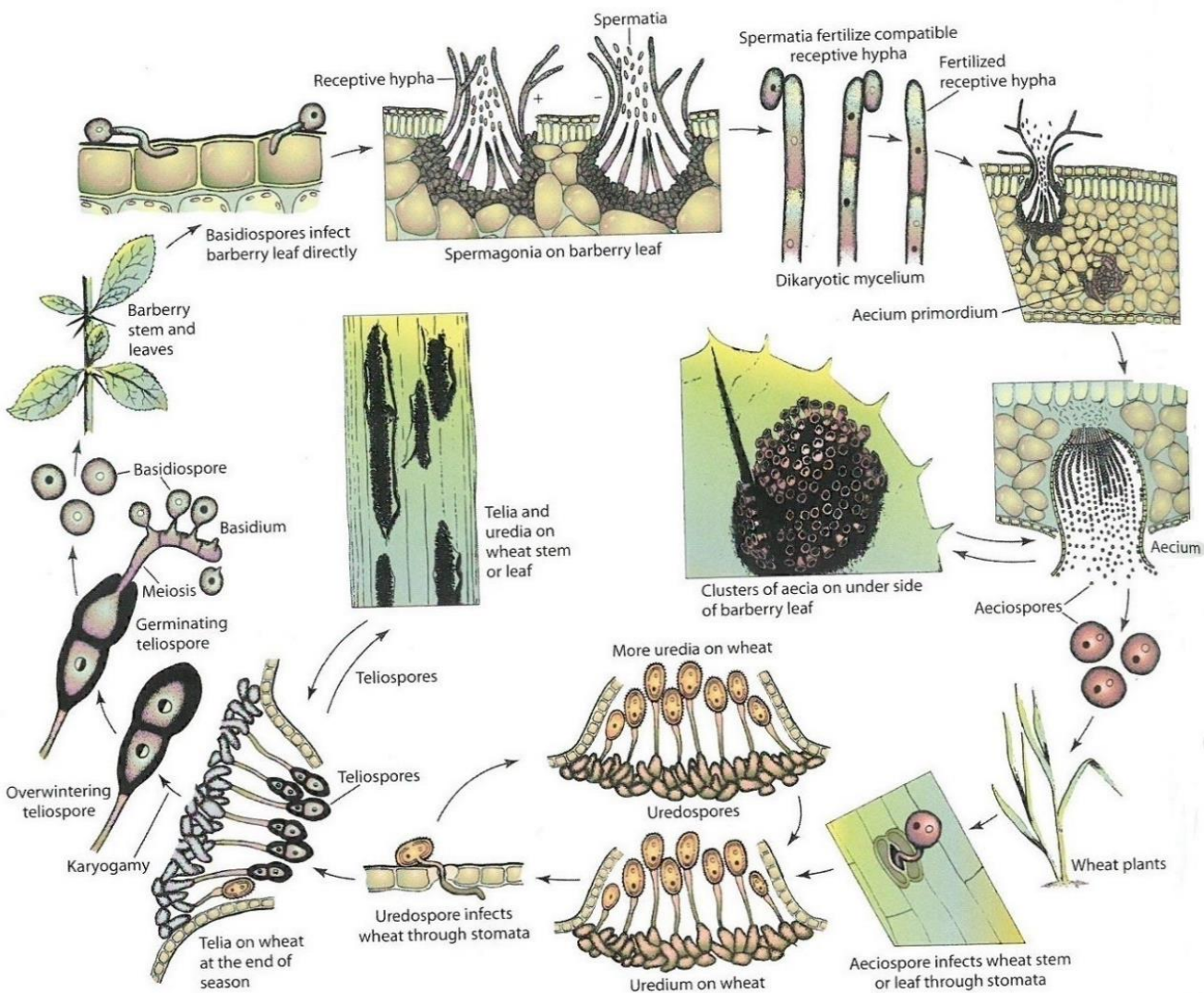
### **2.3.2. Ciclo de vida roya del trigo**

La roya del trigo es una roya más compleja debido a sus fases de reproducción y a sus hospederos. Se clasifica como macrocíclica lo cual quiere decir que presenta el ciclo completo (Basidiospora, teliospora, espermacios, aecidiospora, uredospora) (Figura 3). A la vez es también una roya heteroica, debido a que necesita de dos hospederos para completar su ciclo (*Barberis vulgaris* y *Triticum aestivum*) (Agrios 2005).

Las teliosporas sirven en la etapa sexual después de la hibernación y forman el tubo germinativo en la primavera que posteriormente producen basidios. En los basidios se lleva a cabo la etapa de meiosis y se forman cuatro basidiosporas, las cuales se transportan a través del viento y se depositan sobre *B. vulgaris*. Las basidiosporas que caen sobre plantas jóvenes de *B. vulgaris* logran penetrar las células de la epidermis. Las basidiosporas producen micelios haploides que dan paso a la espermogonios negativos o positivos (picnidios) con espermacios negativos o positivos (picnidiósporas) e hifas receptoras. Los espermacios actúan como gametos y son incapaces de infectar plantas; se encargan de la fertilización de la hifa receptora compatible (negativa si el gameto es positivo y viceversa). Este proceso origina los primeros micelios dicarióticos que producen ecios los cuales contienen las aecidiosporas. Estas rompen el tejido de la hoja, caen sobre el trigo, germinan y forman uredios que producen uredosporas que infectan las plantas de trigo. Durante el verano, no se producen uredosporas y se originan nuevamente teliosporas (Agrios 2005; Voegelé *et ál.* 2009).

Las uredosporas pueden viajar cientos de kilómetros a través del viento. Hay más presencia de estas luego de ocho a diez días de infectada la planta. Las uredosporas pueden reinfectar plantas de trigo con presencia de rocío, agua libre o con humedad relativa cerca del punto de saturación. Esta nueva infección continúa hasta el momento de la madurez. La mayor parte de pérdidas en producción de trigo se da por la presencia de uredosporas sobre el tallo, hojas y vainas (Agrios 2005).





**Figura 3.** Ciclo completo de la roya del trigo. Fuente (Agrios 2005)

## 2.4. Epidemiología y factores que afectan el desarrollo de la roya del café

### 2.4.1. Inóculo inicial y residual

El inóculo inicial es el que da inicio a la epidemia; el residual es el que queda de la epidemia anterior. La cantidad de inóculo inicial determina la precocidad del ataque de la roya sobre el cultivo. Sin embargo, estudios muestran que el nivel final de roya no depende de la cantidad de inóculo inicial; si no, en su mayoría, del inóculo secundario y de las condiciones climáticas que lo favorecen (Kushalappa *et ál.* 1983; Avelino y Rivas 2013). Es decir, que la intensidad de la epidemia depende del número de ciclos que esta desarrolle en el año (Avelino y Rivas 2013). La presencia del inóculo inicial depende de la intensidad de defoliación posterior a las cosechas. Estas defoliaciones pueden ser causadas por carga fructífera alta (López-Bravo *et ál.* 2012), períodos prolongados de sequía, desequilibrio nutricional y exposición al sol (Avelino *et ál.* 1999).

El inóculo residual es el responsable de la transmisión de la enfermedad al siguiente año. Estudios muestran que el inóculo se hospeda en hojas viejas (Avelino *et ál.* 1991). En las hojas nuevas que brotan

después de invierno no se observan inicialmente síntomas de la enfermedad; esto indica que la roya sobrevive durante la época seca en las hojas viejas. Las lluvias activan la esporulación de lesiones latentes o viejas presentes sobre estas hojas (Avelino *et ál.* 1999). Estudios hechos en Guatemala en 1991 y 1992 demuestran que los tratamientos que habían tenido una mejor respuesta a las aplicaciones habían conservado mayor número de hojas y por lo tanto mayor cantidad de inóculo residual. Estos tratamientos tuvieron epidemias más precoces posteriores que el mismo testigo, el cual había sido defoliado intensamente. Con esto es importante observar que la defoliación juega un papel importante como agente regulador de la enfermedad (Avelino *et ál.* 1999).

#### **2.4.2. Época de lluvia**

Tanto en el proceso de dispersión y germinación se necesita agua libre disponible (Avelino *et ál.* 1999). Es por esta razón que la enfermedad se desarrolla con mayor facilidad durante períodos de lluvia que en períodos secos (Avelino *et ál.* 1991), y en zonas donde la precipitación anual es abundante (Avelino *et ál.* 1999). Sin embargo, las épocas secas cortas no limitan necesariamente el desarrollo de la epidemia (Avelino *et ál.* 2015), debido a que existen otras fuentes de agua disponibles, como el rocío, que ayudan en la germinación (Avelino y Rivas 2013).

#### **2.4.3. Temperatura y altitud**

El período de incubación de la roya se acorta cuando las temperaturas son favorables debido a que la germinación, la formación de apresorios y la colonización de la hoja interactúan con la temperatura (Avelino y Rivas 2013). Durante eventos de temperaturas en que la amplitud térmica disminuye, es decir, que no hay ni excesos de temperatura altas ni muy bajas, la incubación se acorta permitiendo mayor desarrollo de la enfermedad (Avelino *et ál.* 1999). Esto pudo observarse durante la epidemia del 2012-13 en Centroamérica y 2008-11 en Colombia, en donde la amplitud térmica diaria disminuyó (Avelino *et ál.* 2015).

Avelino *et ál.* (1999), mencionan que en 1983 en Honduras, a 1200 msnm el período de latencia estuvo entre 40 y 80 días, debido a que las temperaturas se mantuvieron entre 18 y 27°C. A una mayor altitud, el control de la enfermedad es menor ya que la roya no logra desarrollarse tan rápido (Avelino *et ál.* 1999). Sin embargo, estudios muestran que en Guatemala no hubo diferencias en el ataque de roya a una altitud de 400 y 1400 msnm durante el 2012. Esto indica que el incremento de temperaturas mínimas favoreció la presencia de la enfermedad, lo cual podría deberse a la adaptación de las cepas de roya a diferentes alturas (Avelino y Rivas 2013).

#### **2.4.4. Carga fructífera y período de cosecha**

Las epidemias más fuertes se observan a medida que aumenta la producción del café y el crecimiento del fruto (Avelino *et ál.* 1999; Silva-Acuña *et ál.* 2000). El ritmo de ataque de la roya es por lo tanto bienal, al igual que el ritmo de la producción de café. Esto puede explicarse de diferentes maneras: el crecimiento del fruto podría responder a los mismos estímulos del clima que los que afectan la roya. Probablemente se deba a que la susceptibilidad fisiológica de las hojas se incrementa a medida que aumenta la producción, como se mencionó anteriormente, ya que la planta se enfoca en el crecimiento del fruto. Se ha propuesto que, sus defensas disminuyen por la translocación de compuestos fenólicos de las hojas hacia los frutos volviendo la planta más susceptible a la roya (Silva-Acuña *et ál.* 2000). Un



ejemplo de esto fue observado en Brasil, donde los aumentos en producción también aumentaban la presencia de la roya anaranjada del café (Carvalho *et ál.* 2011).

Producciones elevadas también inducen a una mayor defoliación y esto unido a una infección fuerte de roya, provocan caída de las hojas del café. Sin embargo, esta consecuencia también ayuda a eliminar el inóculo; así, con menor inóculo residual y baja producción, la enfermedad alcanza niveles bajos (Avelino *et ál.* 1999). El mayor promotor de la enfermedad es el cosechador que lleva entre la ropa uredosporas de roya que se transmiten a secciones nuevas (Avelino *et ál.* 1991). Es por esta razón que debe darse mucha importancia a la protección del cafeto antes de entrar a períodos de cosecha y así evitar la rápida diseminación (Avelino *et ál.* 1999).

#### **2.4.5. Interacción de la sombra con plagas y enfermedades**

El uso de sombra en sistemas de cultivo es un método utilizado en diferentes partes del mundo. Algunos árboles son plantados con la expectativa de cumplir la función de sombra para beneficio de cultivos principales; otros son vestigios de bosques y cumplen la misma función. Los árboles además de sombra proveen otros servicios como reciclaje de nutrientes, regulación del microclima y soporte para la biodiversidad (Schroth *et ál.* 2000), siendo particularmente estos dos últimos objeto de estudio.

La variación de sombra influye en los organismos benéficos y plagas en combinación con la humedad y temperatura. Algunas plagas prefieren condiciones cálidas por lo que no se encuentran bajo condiciones de sombra; sin embargo, otras logran obtener las condiciones ideales para su crecimiento bajo sombra. El crecimiento de hongos entomopatógenos también se ve beneficiado de la presencia de sombra en sistemas agroforestales. Sin embargo, estudios muestran que el efecto de la sombra sobre el desarrollo de enfermedades es contradictorio. Por esta razón se hace difícil definir cuál es la sombra ideal para un cultivo, la cual depende además del manejo del cultivo, condiciones ambientales, plagas y enfermedades de la zona (Schroth *et ál.* 2000).

La sombra generalmente reduce el estrés fisiológico de la planta lo cual le permite incrementar la resistencia a plagas y enfermedades oportunistas. Aunque la sombra previene así la presencia y desarrollo de algunos patógenos, algunos de ellos logran desarrollar micronichos que sirven como fuente de inóculo posteriormente. Esto se debe principalmente a que en algunos puntos puede existir exceso de sombra (Schroth *et ál.* 2000), la cual es principalmente un medio heterogéneo, es decir variante.

**Cuadro 1.** Efectos potenciales de la sombra sobre *H. vastatrix* a través de sus efectos sobre las vías de acción que afectan los diferentes procesos de la enfermedad (modificado de Avelino *et ál.* 2004). Fuente (Avelino y Rivas 2013)

Vía de acción	Proceso de la roya anaranjada afectado	Efecto potencial de la sombra sobre cada proceso		Explicación
Lluvia	Dispersión		+/-	La sombra intercepta las gotas de agua. Cuando la lluvia es poco abundante, el agua no llega al café y no se da la dispersión. Cuando las lluvias son abundantes, la sombra canaliza el agua, forma gotas gordas con un impacto potencial sobre el café más fuerte (depende de la altura de la sombra).
Viento	Dispersión		-	La sombra intercepta el viento y reduce la dispersión en seco.
Área foliar	Deposición		+	Si la sombra no es excesiva, el índice de área foliar del café es más alto que a pleno sol (menos hojas, pero más amplias y más longevas). La probabilidad de éxito de la deposición es mayor bajo sombra.
Mojadura	Germinación penetración	y	+/-	La sombra conserva el agua libre procedente de las lluvias en la plantación. Sin embargo, bajo sombra, no hay rocío, única fuente de agua libre en días sin lluvia.
Radiación	Germinación penetración	y	+/-	La sombra intercepta la radiación y facilita la germinación. La sombra intercepta la radiación y disminuye la receptividad de la hoja del café.
Temperatura	Germinación, penetración colonización	y	+	La sombra regula las temperaturas. Particularmente, las temperaturas máximas diarias de las hojas son más bajas que a pleno sol. Las temperaturas se mantienen más cerca del óptimo para la roya anaranjada.
Carga fructífera	Penetración colonización	y	+/-	La sombra reduce el ritmo bienal de la producción. Nunca hay producciones muy elevadas, pero tampoco hay producciones muy bajas. La resistencia fisiológica nunca es alta, nunca es baja
Humedad del suelo	Penetración colonización	y	+	La sombra conserva la humedad del suelo, y favorece la penetración y la colonización
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Esporulación		-	La sombra favorece el mico parásito de la roya anaranjada

#### 2.4.6. Relación de la sombra con la roya del café

El uso de la sombra en el cultivo del café es una práctica común en Centroamérica. Se estima que más del 90% de los cafetales están bajo sombra (Virginio y Domian 2015). Sin embargo, los efectos de la sombra sobre la roya siguen teniendo controversia. Existía la teoría de que la sombra incide en la presencia de roya del café (Blanco 1984), pero, estos efectos hoy en día son menos claros. Algunos autores confirman que la sombra incrementa la incidencia de roya (Staver *et ál.* 2001; López-Bravo *et ál.* 2012); y otros reportan lo contrario (Soto *et ál.* 2002). Otros argumentan que la supresión de sombra facilita la dispersión de uredosporas de roya (McCook 2009) y que el uso de sombra puede ser una solución al manejo de la roya en condiciones similares a la epidemia del 2012 (Avelino y Rivas 2013).

La sombra puede tener efectos opuestos en los diferentes procesos de desarrollo de la roya (Cuadro 1). Puede actuar sobre una vía de acción y desfavorecer o favorecer algunos procesos. Tal es el caso de la intercepción de la luz a través de la sombra que favorece la germinación de las uredosporas. Sin embargo, esto desfavorece la receptividad de la hoja a la enfermedad, a nivel de la penetración. Asimismo, la sombra puede afectar el mismo proceso en forma opuesta a través de diferentes vías de acción. La sombra puede evitar temperaturas extremas lo cual ayuda a la penetración, pero al mismo tiempo regula la carga fructífera de la planta, lo cual desfavorece este mismo proceso; también permite que se conserve el agua libre que se origina de las lluvias. Esto favorece la germinación y penetración de la uredospora. Pero al mismo tiempo no existe rocío bajo sombra, siendo esta la única fuente de agua libre para días sin lluvia. De esta manera podemos decir que la sombra favorece y desfavorece un mismo proceso en interacción con el clima (Avelino y Rivas 2013).

Observaciones empíricas en Centroamérica durante el 2012, indican que, tras la epidemia de la roya, las plantaciones a pleno sol tuvieron mayores pérdidas que bajo sombra. La hipótesis es que la sombra ayuda en la intercepción de rocío que elimina la única fuente de agua para germinación cuando no llueve (el segundo semestre del año fue poco lluvioso) y mejoró el crecimiento de la planta a través de la conservación de la humedad del suelo (López-Bravo *et ál.* 2012; Avelino y Rivas 2013).

López-Bravo *et ál.* (2012) mencionan que el porcentaje de sombra hace que las condiciones de microclima favorezcan la infección de la roya del café. La sombra favorece la germinación de uredosporas (Avelino y Rivas 2013), debido a un aumento de la mojadura de la hoja (López-Bravo *et ál.* 2012) que conserva especialmente el agua libre ocasionada por la lluvia facilitando los procesos de infección (Avelino y Rivas 2013) (Cuadro 1). Cuando la sombra no es excesiva, tiende a aumentar el área foliar del café y prolonga la vida útil de las hojas, lo cual favorece la intercepción de las uredosporas por la hoja (Avelino y Rivas 2013). Sin embargo, la intensidad de la roya tiende generalmente a disminuir a mayor sombra debido a que la carga fructífera es menor (López-Bravo *et ál.* 2012). La disminución de luz ocasiona que la planta baje sus rendimientos y esto favorece la resistencia fisiológica de la planta (Schroth *et ál.* 2000). Avelino *et ál.* (2011) confirman que a mayor porcentaje de sombra hay menor incidencia de roya y esto se relaciona con un menor número de nudos de fructificación por árbol. Estudios muestran que microorganismos (especialmente hongos) que son benéficos ayudan a los controles de la roya, debido a que la sombra permite el desarrollo de estos a través del microclima que se genera; este es el caso del hongo benéfico *Lecanicillium lecanii* (Hindorf y Omondi 2011). A la vez la sombra disminuye la dispersión de la roya a través del viento, pues su velocidad se reduce con la presencia de

sombra (Avelino y Rivas 2013). Además, hay una disminución en la densidad de estomas lo que podría dificultar la esporulación de la roya.

La sombra también tiene efectos más complejos que interactúan con el clima. Interviene en los procesos de dispersión a través de viento y agua; y con el viento disminuyendo la velocidad con que este llega al cultivo (Avelino y Rivas 2013). Por otro lado, cuando llueve la dispersión por agua podría incrementarse bajo sombra ya que en el dosel superior se forman canales que provocan que gotas gruesas caigan sobre las plantas (Avelino y Rivas 2013). Aunque no caen muchas gotas, la energía cinética y la fuerza con la que caen permiten una mayor dispersión de las uredosporas en el aire (Avelino *et ál.* 2004). Asimismo el impacto de las gotas sobre la superficie de las hojas mojadas también provoca salpique o *splashing* que interviene en la dispersión a través del agua (Fitt *et ál.* 1989) Sin embargo, otros autores muestran que cuando hay lluvias ligeras el agua no llega al café; por lo tanto no hay un proceso de dispersión (Avelino y Rivas 2013).

### **3. Principales resultados**

La esporulación por rama presentó diferencias significativas en interacción con la sombra y con el estrato del café. Los valores más altos coinciden con los períodos de mayor precipitación dentro del período evaluado. Estos corresponden a la condición bajo sombra del estrato medio de la planta de café con 326 903 uredosporas por rama, seguido de la condición sombra en el estrato alto del café con 138 963 uredosporas por rama y de la condición al sol en el estrato bajo del cafeto con 137 999. Estos resultados podrían indicar que hay un efecto de microclima dentro de la misma planta que induce a una mayor esporulación. La intensidad de esporulación presentó diferencias por efecto de la sombra sobre los tratamientos. El tratamiento de sombra presentó un promedio de 41 160 uredosporas/cm<sup>2</sup> en comparación de pleno sol con 30 798 uredosporas/cm<sup>2</sup>. No hubo efecto de la sombra sobre la etapa de dispersión evaluada a través del salpique de las gotas de lluvia. Sin embargo, la interacción del tratamiento con los estratos del café mostró un mayor número de esporas dispersadas por salpique en los estratos altos y bajos del café en condiciones de pleno sol (3,4 y 3,3 uredosporas/cm<sup>2</sup> respectivamente), y bajo sombra en el estrato medio (2,6 uredosporas/cm<sup>2</sup>). Asimismo, la sombra afectó la dispersión a través del lavado de uredosporas, dando como resultado un mayor número de esporas lavadas a pleno sol (16/cm<sup>2</sup>) que bajo sombra (8/cm<sup>2</sup>). Finalmente, la sombra no tuvo ningún efecto en el proceso de deposición ( $p>0,05$ ). Sin embargo, las interacciones de los estratos del café con el lado de la hoja tuvieron efectos significativos ( $p<0,05$ ). El mayor número de esporas depositadas se observó en el haz de las hojas de los estratos bajos del café.

#### **4. Principales conclusiones**

- La sombra, en interacción con los estratos del café, incrementa la cantidad total de uredosporas producidas y la intensidad de esporulación.
- La sombra no tiene efectos sobre la dispersión a través del salpique. Sin embargo, la interacción entre la sombra y los estratos del café sí causa efectos en la dispersión de uredosporas por salpique.
- La sombra reduce el lavado de uredosporas por lluvia.
- La sombra no tiene efectos sobre la deposición de las esporas. Sin embargo, los estratos del café en interacción con el lado de la hoja sí afectan la cantidad de uredosporas depositadas en las hojas del cafeto.

## 5. Referencias

- Agrios, GN. 2005. Plant pathology. United States of America, University of Florida, Elsevier Academic Press. 952 p.
- Alvarado, AS; Rojas, RC. 1994. Cultivo y beneficiado del café. San José, Costa Rica, EUNED. 184 p. Disponible en [https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=15qrSG-5114C&oi=fnd&pg=PR7&dq=taxonomia+del+cafe&ots=Oe04r6SaaN&sig=aq-1a9Sw48xQibeyxg4p7C9iL7U&redir\\_esc=y#v=onepage&q=taxonomia%20del%20cafe&f=false](https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=15qrSG-5114C&oi=fnd&pg=PR7&dq=taxonomia+del+cafe&ots=Oe04r6SaaN&sig=aq-1a9Sw48xQibeyxg4p7C9iL7U&redir_esc=y#v=onepage&q=taxonomia%20del%20cafe&f=false)
- Avelino, J; Muller, RA; Cilas, C; Velasco Pascual, V. 1991. Development and behavior of coffee orange rust (*hemileia-vastatrix* berk and br) in plantations undergoing modernization, planted with dwarf varieties in south-east Mexico. *Café Cacao* The 35(1):21-37.
- Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacreo, R; Holguin, F; Bertrand, B ; Rapidel, B. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. *In* Benoit, B; Rapidel, B. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica, IICA. p. 194-241.
- Avelino, J; Willocquet, L; Savary, S. 2004. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant pathology* 535:541-547.
- Avelino, J; Zelaya, H; Merlo, A; Pineda, A; Ordoñez, M; Savary, S. 2006. The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling* 1973:431-447.
- Avelino, J ; Ten Hoopen, GM; DeClerck, F. 2011. Ecological mechanisms for pest and disease control in coffee and cacao agroecosystems of the neotropics. *In* Rapidel, B; DeClerck, F; Le Coq, J-F; Beer J. Ecosystem Services from Agriculture and Agroforestry Measurement and Payment. London, Earthscan. p. 91-117.
- Avelino, J; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. HAL archives-ouvertes 47. Disponible en [https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/file/LA\\_ROYA\\_ANARANJADA\\_DEL\\_CAFETO\\_V1.pdf](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/file/LA_ROYA_ANARANJADA_DEL_CAFETO_V1.pdf)
- Avelino, J; Cristancho, M; Georgiou, S; Imbach, P; Aguilar, L; Bornemann, G; Läderach, P; Anzueto, F; Hruska, AJ; Morales, C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 72:303-321.
- Blanco, M. 1984. Cultivos industriales. El café. Managua, Nicaragua, Universidad Nacional Autónoma.
- Boudrot, A; Pico, J; Merle, I; Granados, E; Tixier, P; Vélchez, S; Virginio Filho, EdM; Casanoves, F; Tapia, A; Allinne, C; Rice, R; Avelino, J. 2016. Shade Effects on the Dispersal of Airborne *Hemileia vastatrix* Uredosporasporos. *Phytopathology*, 106(6), 572-580.
- Barquero, MM. 2013. Recomendaciones para el ombate de la roya del cafeto. Tercera ed. San José, Costa Rica, ICAFE. 63 p.
- Cannell, MRG. 1985. Physiology of the coffee crop. *In Coffee* ). Springer US. p. 108-134
- Carvalho, CR; Fernandes, RC; Carvalho, GMA; Barreto, RW ; Evans, HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS One* 6(11):e26387. doi:10.1371/journal.pone.0026387
- Chalfoun, S; Zambolim, L. 1985. Ferrugem do cafeeiro. *Informe Agropecuario (Brasil)* 11(126):42-46.
- Coutinho, T; Rijkenberg, F; Van Asch, M. 1993. Appressorium formation by *Hemileia vastatrix*. *Mycological Research* 97(8):951-956.

- De Jong, E; Eskes, A; Hoogstraten, J; Zadoks, J. 1987. Temperature requirements for germination, germ tube growth and appressorium formation of urediospores of *Hemileia vastatrix*. Netherlands Journal of Plant Pathology 93(2):61-71.
- Evans, HC. 1993. Studies on the rust *Maravalia cryptostegiae*, a potential biological control agent of rubber-vine weed (*Cryptostegia grandiflora*, Asclepiadaceae: Periplocoideae) in Australia, I: Life-cycle. Mycopathologia 124(3):163-174.
- Fernandes, RdC; Evans, HC; Barreto, RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology 34(2):108-113.
- Figueiredo, M; Passador, M. 2008. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo 75(1):117-134.
- Fitt, BD; McCartney, H; Walklate, P. 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. Annual Review of Phytopathology 27:241-270.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43:205-227.
- Granados, BE. 2015. Evaluación de la incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en plantas de café bajo diferentes intensidades de sombra y estrategias de manejo. Thesis Lic. Turrialba, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 74 p.
- Hindorf, H y Omondi, CO. 2011. A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. Journal of Advanced Research 2(2):109-120.
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2014. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica San Jose, Costa Rica. Consultado 20 de octubre 2015 Disponible en [http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/congresos\\_cafetaleros/2014/InformeActividadCafetalera2014.pdf](http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/congresos_cafetaleros/2014/InformeActividadCafetalera2014.pdf)
- Kushalappa, A; Akutsu, M; Ludwig, A. 1983. Application of survival ratio for monocyclic process of *Hemileia vastatrix* in predicting coffee rust infection rates. Phytopathology 73:96-103.
- Kushalappa, AC; Eskes, AB. 1989. Advances in coffee rust research. Annual Review of Phytopathology 27:503-531.
- López-Bravo, D; Virginio, FEdM; Avelino, J. 2012. Shade is conducive to coffee rust as compared to full sun exposure under standardized fruit load conditions. Crop Protection 38:21-29.
- McCain, J; Hennen, J. 1984. Development of the uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. Phytopathology 74:714-721.
- McCook, S. 2009. La roya del café en Costa Rica: Epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. Revista de Historia 59-60:99-117
- Phillips-Mora, W; Cawich, J; Garnett, W; Aime, M. 2006. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. Plant Pathology 55:58:.
- Pico, RTJ. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 79 p.
- Rajendren, RB. 1967. A new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. Mycologia 59(2):279-285.
- Rojo, JE; Pérez, UCE. 2014. Café I (G. *Coffea*). Reduca (Biología). Serie Botánica 7(2):113-132.

- Saccas, AM. 1971. La rouille des cafeiers due a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Bulletin-Institut Francais du Café et du Cacao no. 10: 123 p.
- Savary, S; Janeau, J-L. 1986. Rain-induced dispersal in *Puccinia arachidis*, studied by means of a rainfall simulator. Netherlands Journal of Plant Pathology 92(4):163-174.
- Schroth, G; Krauss, U; Gasparotto, L; Aguilar, JD; Vohland, K. 2000. Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics. Agroforestry Systems 50(3):199-241.
- Silva, AR; Rosales Mondragón, M; Tenías Tenías, J. 2000. Aspectos fisiológicos del cafeto: su influencia en el ataque de la roya. FONAIAP DIVULGA. VE 68:44.
- Silva, M; Guerra-Guimarães, L; Loureiro, A; Nicole, M. 2008. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). Physiological and Molecular Plant Pathology 72(1-3):29-38.
- Soto, PL; Perfecto, I; Caballero, NJ. 2002. Shade over coffee: its effects on berry borer, leaf rust and spontaneous herbs in Chiapas, Mexico. Agroforestry Systems 55(1):37-45.
- Staples, RC. 2000. Research on the rust fungi during the twentieth century. Annual Review of Phytopathology 38:49-69.
- Staver, C; Guharay, F; Monterroso, D; Muschler, RG. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. Agroforestry Systems 53(2):151-170.
- Virginio, FEdM; Domian, CA. 2015. Prevención y control de la roya del café. Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 96 p. (Serie Técnica. Manual Técnico no. 131).
- Voegelé, RT; Hahn, M; Mendgen, K. 2009. The uredinales: cytology, biochemistry, and molecular biology. In Deising, HB (ed.). The Mycota. Berlin, Germany, Springer. p. 69-98.
- Zuluaga, CM; Céspedes, PB; Marín, MM. 2008. Generalidades de los uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. Acta biol. Colomb. 14(1):41-56.



## **Artículo I. Efecto de la sombra de cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) del café sobre la esporulación, dispersión a través del agua y deposición de *Hemileia vastatrix***

### **Resumen**

La enfermedad de la roya anaranjada que se da en el café, es causada por el patógeno llamado *Hemileia vastatrix*. Este es un hongo que causa pérdidas económicas a este cultivo, como las producidas durante el ataque del 2011-12 en Centroamérica. Actualmente existen diferentes estrategias para minimizar el efecto que esta enfermedad tiene sobre el cultivo; una de ellas es el uso de la sombra, pero su efecto es controversial. Debido a ello, se investigó el efecto de la sombra sobre los procesos del ciclo de vida del patógeno aún no estudiados, como la esporulación, dispersión de las uredosporas a través del agua y deposición.

La investigación se realizó de enero a septiembre de 2016 en la finca del Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicada en Turrialba, Costa Rica, en el ensayo a largo plazo de sistemas agroforestales con café. Se trabajó en las parcelas bajo sombra de cashá y pleno sol, distribuidas cada una en tres bloques (repeticiones). Las mediciones se hicieron cada dos semanas en un bloque a la vez. Se cuantificó la cantidad de uredosporas por  $\text{cm}^2$  y las producidas por rama a través de muestreos de hojas enfermas y estimaciones del área afectada con Image J. El número de uredosporas por  $\text{cm}^2$  perdidas por el lavado de la lluvia se midió en el agua colectada en recipientes ubicados bajo las plantas de café y las entrecalles. El número de uredosporas dispersadas por  $\text{cm}^2$  a través del salpique se calculó con el uso de platos Petri invertidos con papel filtro. La deposición por  $\text{cm}^2$  de hoja se obtuvo aplicando acrílico sobre el haz y envés de las hojas. Los datos fueron analizados con modelos lineales generalizados y mixtos y con modelos lineales generales y mixtos.

La esporulación por rama fue mayor bajo condiciones de sombra en interacción con la posición de la rama (estrato medio más infeccioso) y las fechas de muestreo con un máximo de 326 903 uredosporas/rama. La intensidad de esporulación fue mayor bajo condiciones de sombra (41 160 uredosporas/ $\text{cm}^2$  en promedio), que a pleno sol (30 798 uredosporas/ $\text{cm}^2$ ). El proceso de dispersión a través del salpique de las gotas de lluvia en interacción con el estrato del café mostró diferencias; siendo mayor en los estratos bajo y alto en condiciones de pleno sol (promedio de 3,3 uredosporas/ $\text{cm}^2$  en ambas condiciones) y en el estrato medio del cafeto en condiciones de sombra (promedio de 2,6 uredosporas/ $\text{cm}^2$ ). El lavado de uredosporas fue mayor a pleno sol con un 33% del *stock* de inóculo presente que bajo sombra de cashá con 8%. El efecto de la sombra sobre la deposición de uredosporas de roya no fue significativo ( $p=0,3746$ ). Sin embargo, la interacción del estrato del cafeto y el lado de la hoja (haz/envés) fue significativa y fue mayor en el estrato bajo del café (aproximadamente 1 uredospora/ $\text{cm}^2$ ).

Los resultados de la investigación demuestran que la sombra favorece la conservación de las esporas y la intensidad de esporulación, lo cual da elementos importantes para buscar rasgos de las plantas utilizadas como sombra que reduzcan los efectos negativos ocasionados por la misma. El menor lavado de las esporas está posiblemente relacionado con (i) la intercepción del agua de lluvia por el dosel y (ii) el incremento del tamaño de las gotas de agua que atraviesan el dosel y de su energía cinética. Ambos puntos contribuyen a reducir la intercepción del agua por los cafetos. Árboles de menor altura y fácilmente manejables, de hojas pequeñas, recortadas y flexibles serían ideales para permitir un mayor lavado de las esporas. La sombra muestra un efecto claro sobre los procesos de esporulación y la

dispersión a través del lavado por lluvia, pero el efecto de la sombra sobre los procesos de dispersión por salpique y la deposición siguen teniendo efectos inconclusos. Esto motiva el seguimiento de la investigación sobre estos procesos.

## 1. Introducción

La roya anaranjada es un patógeno del cultivo del café que ataca principalmente a la especie *C. arabica*. Aunque su origen es africano, tuvo sus primeros ataques en las islas de Ceilán ahora Sri Lanka en Asia en 1869 (Avelino *et ál.* 1991). Fue nombrada por Berkeley con el nombre de *Hemileia vastatrix* en ese mismo año (Blanco 1984; Chalfoun y Zambolim 1985).

La roya anaranjada ha provocado pérdidas económicas importantes. Por ejemplo, Ceilán pasó de ser el tercer productor a nivel mundial de café a tener pérdidas del 95% en 1893 con respecto a las producciones de 1879 (Saccas 1971). La enfermedad se dispersó a partir de esta isla a toda Asia. En 1970, se dan los primeros reportes de roya en Brasil (McCook 2009), donde debido a la presencia de la enfermedad se tomaron diferentes medidas de control para erradicarla; sin embargo, estas no dieron resultado. A Centroamérica llegó en 1976; los primeros casos se reportan en Nicaragua y luego se extendieron a toda la región. Durante más de tres décadas se logró convivir con la enfermedad gracias al uso de fungicidas de forma moderada, la implementación técnicas para mejorar la productividad y la utilización reducida de variedades resistentes (Avelino *et ál.* 1999; Staples 2000; Avelino y Rivas 2013).

A partir del 2008, se observaron ataques de la enfermedad más intensos que los observados en los años anteriores. En Colombia, durante el período 2008-2011, el ataque de roya causó pérdidas del 30% en comparación con el año 2007. La epidemia más importante de la historia en la región Centroamericana y México se dio durante el 2012 causando pérdidas del 16% en relación con el período de 2011-2012 y de un 10-13% en el período 2013-2014 con respecto a la producción del 2012-2013. También se reportaron ataques importantes en Ecuador y Perú durante el 2013. (Avelino y Rivas 2013; ICAFE 2014; Avelino *et ál.* 2015). Esta crisis provocó pérdidas importantes desde el primer año de ataque. Durante el 2012, se observó un ataque precoz de la roya anaranjada y consecuentemente una muerte prematura de las bandolas, lo cual es poco usual, ya que el efecto de la roya sobre el café se observa el siguiente año de producción con respecto al ataque (Avelino y Rivas 2013).

Avelino *et ál.* (2015) atribuyen estos ataques a factores económicos y ambientales. Epidemias de fuerte intensidad han coincidido con la reducción del precio del café durante las epidemias de 1989-1990 en Costa Rica y 2002-2003 en El Salvador y la del 2012-2013 en Centroamérica. Las alzas del costo de los insumos han sido asociadas a las epidemias del 2008-2011 en el caso de Colombia. La poca rentabilidad del cultivo no permitió que se diera un manejo adecuado a las plantaciones de café, ocasionando así que las plantas fueran más expuestas a plagas y enfermedades (Avelino y Rivas 2013).

Otro factor importante que incide en la epidemia de roya es el factor climático. En Centroamérica en 2012, se registró una reducción de la amplitud térmica diurna (Avelino *et ál.* 2015); es probable que estos cambios de temperatura redujeran el período de latencia de la enfermedad. Durante ese mismo año, se observaron también irregularidades en las condiciones de precipitación; la temporada de lluvia comenzó antes de lo normal en Centroamérica, lo que probablemente indujo la aparición temprana de la roya. Por el contrario, en la segunda mitad del año llovió menos, lo cual benefició el desarrollo de la

enfermedad, ya que lluvias menos frecuentes conducen a una mayor conservación de las uredosporas (Avelino *et ál.* 2015).

Aunque la epidemia del 2012 fue generalizada a nivel de Centroamérica, México, el Caribe y Colombia, los niveles alcanzados variaron según factores locales. Prácticas como el uso de fertilizantes, fungicidas, densidades de siembra, la variedad del café y el manejo de la sombra son algunos ejemplos (Avelino y Rivas 2013). Estudios han demostrado que las epidemias de roya son más intensas cuando el rendimiento del café es alto, probablemente debido a la translocación de compuestos fenólicos de hojas a frutos (Avelino *et ál.* 2015), que debilita la resistencia fisiológica de la planta. Esto es más frecuente en condiciones de pleno sol, ya que se logran mayores rendimientos. La exposición a pleno sol y el desarrollo de la enfermedad pueden ocasionar defoliaciones precoces (Avelino *et ál.* 2011; Avelino y Rivas 2013). La sombra permite contrarrestar este efecto, actualmente es una alternativa para enfrentarse al cambio climático porque ayuda a regular las temperaturas (Avelino *et ál.* 2015). Además, la sombra regula la carga fructífera y, consecuentemente, disminuye los niveles de roya (López-Bravo *et ál.* 2012).

Los efectos de la sombra sobre la roya siguen siendo controversiales y muestran aspectos sin resolver. Algunos autores reportan que la sombra aumenta la incidencia de la roya (Staver *et ál.* 2001; López-Bravo *et ál.* 2012), mientras que otros encuentran que reduce la incidencia (Soto *et ál.* 2002). Estudios muestran que al disminuir la cantidad de luz que llega al café se favorece la germinación de las uredosporas (López-Bravo *et ál.* 2012). Como se mencionó anteriormente, la sombra disminuye la carga fructífera y por lo tanto aumenta la resistencia fisiológica del café a la roya (Avelino *et ál.* 2015). Avelino *et ál.* (2006) mencionan que la sombra proporciona condiciones de microclima que favorecen la germinación y penetración del hongo y favorece la presencia del hongo antagónico *Lecanicillium lecanii* que parasita a las uredosporas de roya y contrarresta el ataque (Schroth *et ál.* 2000). Como se puede deducir, existen efectos opuestos de la sombra sobre diferentes procesos de la roya, que posiblemente interactúan con el clima (Avelino *et ál.* 2015), por lo cual es difícil establecer un balance.

Lo anterior también indica que para entender bien el efecto de la sombra es necesario realizar investigaciones considerando los procesos del ciclo de vida de la roya. Por procesos se entienden las diferentes fases de la enfermedad: pre-infección (germinación hasta penetración), colonización, esporulación, dispersión y deposición.

El efecto de la sombra sobre el proceso de pre-infección se ha medido a través de la incidencia de la roya (porcentaje de hojas enfermas). La incidencia es un indicador del éxito de la infección, es decir, de que la germinación y penetración se hayan logrado (Avelino *et ál.* 2004; Pico 2014; Granados 2015). Pico (2014) indica que la sombra incrementa la incidencia de la enfermedad; sin embargo, la sombra también juega un papel importante en el proceso de dispersión. Boudrot *et ál.* (2016) observaron que la interacción entre la sombra y el clima es la que afecta la dispersión de uredosporas: cuando llueve, la sombra posiblemente incrementa la energía cinética de las gotas de agua y favorece la dispersión en el aire; sin embargo, en los días secos la sombra intercepta el viento y reduce la dispersión. Para los procesos de colonización, deposición, esporulación, dispersión en agua, el efecto de la sombra sigue siendo poco conocido (Avelino *et ál.* 2004).

Comprender el efecto de la sombra, en interacción con el clima, sobre cada uno de estos procesos ayudará a identificar los rasgos que la sombra debe de tener para limitar la roya en cada una de sus etapas. En

esta investigación nos enfocamos en entender los efectos de la sombra sobre los procesos de esporulación, dispersión a través del agua y deposición de *H. vastatrix*.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Área de estudio**

#### **2.1.1. Características generales de la ubicación del ensayo**

La investigación se llevó a cabo en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) de enero a agosto de 2016. El trabajo de campo se realizó en el ensayo a largo plazo (15 años) de sistemas agroforestales con café en la finca CATIE (coordenadas 9°53'44'' latitud norte; 83°40'7'' longitud oeste), el cual fue establecido en el año 2000 con café arábica variedad caturra, con distancias de siembra de 2,0 m entre hileras y 1,0 m entre plantas, con una densidad de 5000 plantas/ha. El área es de aproximadamente 9,2 ha. La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de Fitoprotección, Turrialba, Costa Rica. La finca se encuentra a una elevación de 600 msnm; los suelos corresponden a aluviales mixtos, ultisoles e inceptisoles, con textura franco y franco-arcilloso (Virginio *et ál.* 2002). La precipitación es de 2815 mm/año, la temperatura de 22,2°C, la humedad relativa del 91% y la radiación solar de 16,2 Mj/m<sup>2</sup>, promedio en los últimos diez años (CATIE 2016)

#### **2.1.2. Descripción del ensayo agroforestal**

El ensayo cuenta con siete tratamientos (parcelas principales), de tres tipos de cobertura para el café. Las especies de sombra utilizadas son: poró (*Erythrina poeppigiana*), amarillón (*Terminalia amazonia*) y cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) y combinaciones de ellas. También hay un tratamiento a pleno sol. Cada parcela de sombra está generalmente subdividida en cuatro tipos de manejo: medio convencional, alto convencional, bajo orgánico y medio orgánico. No todas las combinaciones están representadas, ya que algunas no son viables (pleno sol orgánico, por ejemplo) o simplemente por limitaciones de espacio. Esto genera que sea un ensayo factorial incompleto; en total se tienen 20 tratamientos distribuidos en tres repeticiones (bloques) (Anexo 1) (Virginio *et ál.* 2002).

#### **2.1.3. Tratamientos de estudio**

En este estudio los tratamientos utilizados son la sombra de cashá y pleno sol con manejo medio convencional. *C. eurycyclum* es una especie leguminosa de la familia Fabaceae. Este árbol puede alcanzar hasta de 25 m de altura y 80 cm de diámetro a la altura del pecho (dap es la circunferencia del fuste a una altura de 1,3 m aproximadamente); la madera es de alto valor comercial; la especie requiere podas de formación debido a su ramificación irregular. El hábitat de la especie va desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm en bosque tropical húmedo, bosque nublado y bosque semideciduo y áreas propensas a inundación (Barrance *et ál.* 2003; Merlo 2007). La densidad de esta especie en el ensayo es de 78 árboles por hectárea.

El manejo convencional que ambas parcelas reciben está conformado por el uso de fertilizantes químicos, en dos aplicaciones de 500 kg de la fórmula 18-5-15 (kg de nitrógeno, fósforo y potasio respectivamente); adicional se hace una aplicación de 180 kg/ha de nitrógeno en forma de urea. El control de malezas se realiza anualmente con cinco aplicaciones de herbicidas a los surcos y cuatro chapias en calles (Merlo 2007). Para el control de enfermedades y plagas se utilizan productos químicos.

Específicamente para el control de la roya se utilizan actualmente productos a base de la familia de los triazoles (Cyprosol ®) a una dosis de 1 cc/L). Cada parcela de muestreo tiene un área de 432 m<sup>2</sup> y está compuestas de 9 surcos y 24 plantas por surco.

El porcentaje de sombra se estimó al inicio del ensayo durante el mes de marzo, como único muestreo, para cada uno de los bloques. Se utilizó un densitómetro esférico en cinco puntos de muestreo, uno en cada punto cardinal y otro al centro de la parcela. Además, se cuantificó la cosecha de los tratamientos sombra densa cashá y pleno sol de mayo a noviembre del 2016.

## **2.2. Metodología para objetivo 1. Cuantificación de la esporulación por rama e intensidad de esporulación de roya y medición del área esporulada con *Lecanicillium lecanii***

Se seleccionaron seis plantas para la recolección de las hojas enfermas de seis bandolas (dos de cada estrato -superior, medio e inferior-; una rama por planta) cada 21 días de forma sistemática; esta práctica se realizó en los tres bloques simultáneamente. Las hojas fueron llevadas a laboratorio en bolsas de plástico debidamente codificadas. De cada hoja colectada se marcaron las lesiones esporuladas, lesiones con *L. lecanii* y lesiones sin esporular. Las hojas fueron fotografiadas a una misma distancia, con fondo y con presencia de una regla.

Posteriormente, en las fotografías se realizó la estimación del área total de lesiones esporuladas con roya, lesiones sin esporular y lesiones con *L. lecanii* usando el programa Image J (Wayne 1997). Las lesiones sin esporulación no se tomaron en cuenta para el conteo en laboratorio.

Luego se realizó un raspado sobre las lesiones de roya esporuladas con un bisturí. La muestra recolectada se colocó en tubos Ependorf de 1,5 ml. Posteriormente, se colocó en cada tubo Ependorf 1 ml de agua estéril al 2,5 % de Tween 80. La muestra se ultrasonificó por cinco minutos para romper partículas adheridas y se agitó en un Mixer para homogenizarla. El conteo de uredosporas por rama se realizó con 10 µl de la suspensión homogenizada en la cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer consiste en una cuadrícula de recuento formada por nueve cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1 mm<sup>2</sup> y una profundidad de 0,1 mm, formados de 16 cuadros pequeños. El conteo de uredosporas se realizó en el cuadrado grande central y en cada uno de los cuadrados grandes de las cuatro esquinas (cinco cuadrados en total). Se tomaron en cuenta las uredosporas que estaban dentro de cada uno de los cuadrados pequeños y las que estaban tocando parcialmente la parte superior y derecha para los cuadrados pequeños exteriores del cuadrado grande. Se realizaron cuatro lecturas de cada muestra, tomando el promedio de las mismas (Cerlomics 2016).

**Ecuación 1.** Ecuación utilizada para el conteo de esporas en la cámara de Neubauer

$$\text{Conteo de esporas} = \frac{\text{Promedio de número de uredosporas}}{\text{Número de cuadros}} \times 10\,000 \text{ (constante)}$$

Las variables respuesta fueron la cantidad de uredosporas totales por rama y la cantidad de uredosporas por cm<sup>2</sup> de área esporulada.

### **2.3. Metodologías para objetivo 2. Conteo de uredosporas dispersadas por salpique**

Este conteo se realizó sólo en un bloque a la vez, durante dos semanas. El primero se realizó en un bloque seleccionado de forma aleatoria; el segundo en uno de los dos bloques restantes escogido también aleatoriamente y el último en el bloque restante. Esta operación se repitió hasta el final del estudio. Se tomaron al menos tres eventos de lluvia durante las dos semanas evaluadas.

La cuantificación de uredosporas dispersadas se hizo en cuatro plantas por parcela. Para el conteo se modificó la metodología propuesta por Savary y Janeau (1986) y Evenhuis *et ál.* (1997). Se utilizaron platos Petri de plástico de 9 cm de diámetro en forma invertida y su fondo se cubrió con un disco de papel de filtro seco, que permitieron la captura de uredosporas dispersadas por salpique (Anexo 6). Las gotas de agua de lluvia solo podían mojar el papel filtro después de rebotar sobre las hojas y salpicar. A cada planta se le colocaron dos platos Petri en tres estratos haciendo un total de 12 platos por planta. Los platos se colocaron a una distancia de 5 cm de las bandolas y 5 cm sobre la orilla de la hoja en cada altura (Anexo 2). Después de una lluvia, las muestras fueron trasladadas al laboratorio.

En el laboratorio se realizaron los siguientes pasos (Anexo 2):

- Cada papel filtro se colocó en tubos de centrífuga de 45 ml
- Estos se llenaron con solución surfactante Tween 80 al 0,01% (v / v)
- Se centrifugó por dos minutos a 2 000 rpm
- Se eliminaron los primeros 35 ml de la solución centrifugada y se dejaron 10 ml para el conteo de uredosporas
- Se realizaron 12 conteos por muestra homogeneizada
- El conteo de uredosporas se realizó con la cámara de Neubauer, tal como se describe para el conteo de esporulación, pero con la excepción de que se contaron las nueve cuadrículas.

Este método se calibró mediante pruebas previas. Se colocaron cantidades conocidas de uredosporas en 1 ml de agua, las cuales fueron distribuidas en el papel filtro seco. Luego se procedió a realizar los pasos descritos anteriormente para finalmente contar el número de uredosporas recuperadas. Se realizó una ecuación de calibración de uredosporas a través de una correlación de uredosporas iniciales en función de uredosporas recuperadas que dio como resultado un  $R^2$  de 0,90 (Anexo 3). Esta ecuación se utilizó para estimar la cantidad real de uredosporas capturadas en las cajas Petri. La variable final fue el número de uredosporas atrapadas por centímetro cuadrado.

### **2.4. Metodología para objetivo 3. Conteo de uredosporas pérdidas por lavado**

Al igual que el procedimiento seguido para el conteo de uredosporas dispersadas por salpique, se trabajó en un solo bloque a la vez durante dos semanas. En cada parcela se seleccionaron tres plantas; para recolectar el agua de lavado se utilizó la metodología propuesta por Savary y Janeau (1986) y Evenhuis *et ál.* (1997) modificada. El agua de lavado se recolectó en 25 botes en cada parcela (15 con capacidad de 3,875 l y 10 de 0,5 l). Sobre los 15 botes grandes se colocaron embudos de 16,3 cm de diámetro; los 10 botes de menor volumen, con un área de captura de 6,1 cm de diámetro, se dejaron sin embudo. Se distribuyeron diez botes en la entrecalle y cinco debajo de cada planta de café (a la mitad de la bandola más baja) (Anexo 7). Se recolectaron de 1 a 4 eventos de lluvia en cada bloque (cada dos

semanas), posterior a un evento de lluvia. Lo botes se marcaron y taparon para ser transportados al laboratorio.

En el laboratorio se realizaron los siguientes pasos (Anexo 4):

- Se midió el volumen de agua colectado en probetas y se rotuló con el nombre de cada parcela, planta y área de captura.
- Se colocaron 10 ml de Tween al 2,5% en cada probeta para limpiarlas.
- Se vertió el agua colectada más los 10 ml en Beakers o Erlenmeyers según la capacidad. Al momento de verter el agua, se colocó un tamiz de 50 micrómetros para filtrar la muestra y eliminar partículas grandes.
- Se colocó la muestra en el ultrasonificador durante 5 minutos para romper partículas adheridas.
- Luego se agitó la muestra durante un minuto.
- Posteriormente, se vertió la muestra en tubos de centrifuga. Si la muestra era mayor a 100 ml se tomaron dos tubos llenos a 45 ml. Si la muestra era menor a 100 ml se tomó sólo un tubo a 45 ml.
- Se colocó la muestra en la centrifuga durante tres minutos a 2 000 rpm.
- Posteriormente se eliminaron los primeros 40 ml de la muestra centrifugada y se dejaron solo 5 ml en el tubo. Esto correspondió al fondo del tubo.
- El tubo de centrifuga fue colocado nuevamente en el ultrasonificador durante 5 minutos con el fin de dispersar las uredosporas que pudieron agruparse durante el proceso de centrifuga.
- Luego se agitó en el Mixer durante 30 segundos.
- Posteriormente se realizaron 12 conteos por muestra en la cámara de Neubauer.

Para esta metodología se realizó una calibración mediante pruebas previas. Para ello se colocó una solución conocida de uredosporas en 500 ml de agua. Luego se realizaron todos los pasos antes indicados y se hizo un conteo de uredosporas recuperadas de todo el proceso. Se realizó una correlación entre las uredosporas por mililitro colocadas en función de las recuperadas y se obtuvo una ecuación de calibración con un  $R^2$  de 0,89 (Anexo 5). Esta ecuación se utilizó para estimar la variable final del número de uredosporas lavadas por centímetro cuadrado de terreno.

## **2.5. Metodología para objetivo 4. Conteo de uredosporas por deposición en la superficie de hojas de café**

Se trabajó en un solo bloque a la vez durante dos semanas de la misma forma que en los conteos por salpique y lavado. Para el conteo de esporas por deposición se utilizó la metodología propuesta por Bock (1962). En cada parcela se seleccionaron cuatro plantas al azar que se dividieron en tres estratos (alto, medio y bajo). Posteriormente, se seleccionaron cuatro hojas al azar en cada estrato en el tercer y cuarto nudo de la rama saliendo de su extremidad. Estas hojas son normalmente de color verde claro y altamente susceptibles (hojas terciopelo). De las cuatro hojas seleccionadas, en dos se tomaron muestras del haz y en las otras dos del envés. Sobre las orillas de cada hoja y sobre la parte ondulada donde deberían acumularse las uredosporas transportadas por el agua, se colocó un esmalte de uñas transparente; en cada hoja, se abarcó alrededor de 2 cm<sup>2</sup> (Anexo 8). Luego se dejó secar la muestra y el acrílico se desprendió de la hoja y se colocó en láminas de portaobjetos con su respectivo cubreobjetos. Se recolectaron muestras de tres eventos de lluvia y de tres eventos secos durante las dos semanas de evaluación;

posteriormente fueron llevadas al laboratorio para contar las uredosporas encontradas (Anexo 6). El resultado obtenido en este objetivo es el de uredosporas por centímetro cuadrado de hoja.

## 2.6. Metodología para la toma de datos de microclima

En cada una de las parcelas en las que se hicieron las capturas de esporas dispersadas por lavado, por salpique y depositadas, se instaló una estación climática. Inicialmente (a partir de febrero), se trabajó con estaciones marca Hobbo®; pero estas se descompusieron y se cambiaron por estaciones marca Campbell® a partir del 25 de abril de 2016. En cada estación se tenía un sensor de temperatura y humedad relativa y un anemómetro. Además, en la parcela a pleno sol, se tenía un pluviógrafo instalado por encima de los cafetos. El *datalogger* registró promedios de datos tomados por los sensores por períodos de 5 minutos. La información se recolectó cada 15 días. Los datos de temperatura y humedad relativa fueron transformados de acuerdo a ecuaciones de calibración previamente establecidas. Los datos faltantes se dedujeron de ecuaciones de calibración construidas con los datos de la estación del ensayo agroforestal de café de la finca CATIE. De este monitoreo, se dedujeron las variables siguientes por hora: temperatura, humedad relativa, promedio de la velocidad del viento, velocidad máxima del viento, precipitación, horas con lluvia, horas sin lluvia, intensidad de la lluvia.

### 2.6.1. Energía cinética de las gotas

La medición de la energía cinética de las gotas se realizó en el mismo bloque que el conteo de uredosporas dispersadas por salpique, por lavado y el conteo de las uredosporas depositadas. Para este propósito se utilizó un instrumento denominado *splashcup* (Scholten *et ál.* 2011). El *splashcup* es un recipiente con arena calibrada (125-200  $\mu\text{m}$ ), conectada a un frasco de plástico con agua. En el fondo del recipiente se coloca una cubierta de seda para evitar la pérdida de arena y garantizar el drenaje del agua. El recipiente se conecta con el frasco con agua a través de una mecha de algodón para mantener la humedad de la arena (Anexo 3). Antes de ser llevado a campo, el recipiente se pesa en seco y posteriormente se humedece. Después de ser expuesto al impacto de las gotas de agua, se traslada al laboratorio donde se seca en la estufa a 80°C durante 48 horas; luego se vuelve a pesar. El peso registrado permite encontrar cuanta arena se perdió.

La energía cinética se deduce de la pérdida de arena por lluvia proyectada fuera del recipiente, de acuerdo a la ecuación de calibración siguiente (Scholten *et ál.* 2011).

$$EC = \text{Sandloss} (g) \times 0,1455 \times (10\,000 / \pi r^2)$$

donde:

EC = Energía cinética en  $\text{J/m}^2$

Sandloss= La arena perdida durante la lluvia (en gramos)

$\pi$ = 3,1416 (constante)

r= radio del *splashcup* (cm)

Para medir la energía cinética de las gotas de agua, se seleccionaron 4 árboles de cashá que generaban sombra densa sobre la parcela útil. Se ubicaron ocho *splashcups* (dos por cada árbol), uno a una distancia de 1,5 metros del tronco y el otro al borde de la copa dentro del surco del café. Además, se ubicaron tres



*splashcups* en la parcela a pleno sol. Los *splashcups* se ubicaron a una altura de 2 m, idealmente sobre la copa del café. Estos se colectaron durante cinco eventos de lluvia durante las dos semanas de muestreo en cada parcela.

## 2.7. Análisis estadístico de la esporulación por rama, intensidad de esporulación y área esporulada con *Lecanicillium lecanii*

Para el análisis de las variables número de esporas por rama y número de esporas/cm<sup>2</sup> de área esporulada, se utilizaron modelos lineales generalizados y mixtos. Para ambas variables, los efectos fijos fueron el factor sombra, la posición de las ramas muestreadas, el día de muestreo y las interacciones de los factores. El bloque y el efecto de la parcela principal conteniendo los tratamientos de sombra y la parcela principal conteniendo al tratamiento y a la posición se declararon como aleatorios para modelar la estructura del diseño. Se utilizó una distribución de Poisson con enlace Log y la separación de medias se realizó con una prueba de formación de grupos excluyentes DGC (Di Rienzo *et ál.* 2001) con un nivel de significancia  $p < 0,05$ ; a través del uso del software estadístico Infostat (Di Rienzo *et ál.* 2015). El modelo empleado para los análisis de esporulación por rama e intensidad de esporulación fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + D_k + SP_{ij} + SD_{ik} + PD_{jk} + SPD_{ijk} + B_l + S(B)_{i(l)} + P(S(B))_{j(i(l))} + EE_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$ : variable respuesta de la población  
 $\mu$ : media general  
 $S_i$ : efecto del i-ésimo tratamiento (sombra)  
 $P_j$ : efecto de la j-ésima posición  
 $SP_{ij}$ : efecto de la interacción de sombra y posición  
 $B_l$ : efecto de l-ésimo bloque  
 $S(B)_{i(l)}$ : término del error A  
 $P(S(B))_{j(i(l))}$ : término del error B  
 $EE_{ijkl}$ : término de error del modelo

Para el análisis del parasitismo de roya por *L. lecanii* se realizó un promedio por fecha de muestreo del porcentaje de parasitismo. Esta variable no pudo analizarse con un modelo lineal general y mixto, debido a que durante el periodo de muestreo (febrero-septiembre), los niveles de presencia del hongo antagonístico de la roya eran bajos y los valores generalmente corresponden al cero por ciento.

## 2.8. Análisis estadístico de dispersión a través del salpique

El análisis de las variables número de esporas/cm<sup>2</sup> recuperadas por salpique, se realizó mediante modelos lineales generalizados y mixtos. Los efectos fijos fueron el factor sombra, posición (altura) de las cajas Petri y la interacción de ambos factores. El bloque y el efecto de la parcela principal conteniendo los tratamientos de sombra y sol se declararon como factor aleatorio. Se utilizó una distribución de Poisson con la función de enlace Log. La variable número de esporas por rama fue utilizada como covariable en los modelos para tomar en cuenta el *stock* de uredosporas disponibles. La separación de medias se realizó a través del uso del software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2015) con una prueba de formación de grupos excluyentes DGC (Di Rienzo *et ál.* 2001), con un nivel de significancia  $p < 0,05$ ;

El modelo empleado fue el siguiente

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + SP_{ij} + \beta_k \text{Inóculo}_{ijk} + B_l + S(B)_{i(l)} + EE_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$ : variable respuesta de la población  
 $\mu$ : media general  
 $S_i$ : efecto del i-ésimo tratamiento (sombra)  
 $P_j$ : efecto de la j-ésima posición  
 $SP_{ij}$ : efecto de la interacción de sombra y posición  
 $B_k \text{Inóculo}_{ijk}$ : efecto de la covariable número de esporas  
 $B_l$ : efecto de l-ésimo bloque  
 $S(B)_{i(l)}$ : término del error A  
 $EE_{ijkl}$ : término de error del modelo

## 2.9. Análisis estadístico de dispersión a través del lavado de esporas

Para estudiar el efecto de los factores de interés sobre la dispersión de uredosporas a través del lavado por la lluvia, se utilizaron modelos lineales generales y mixtos. Se utilizó la variable logaritmo del número de esporas/cm<sup>2</sup> como variable de respuesta y se declararon como efectos fijos el tratamiento (sombra/sol) y la posición de los frascos (calle, bajo el cafeto). Como efecto aleatorio se declaró el bloque. Se utilizó el número de esporas por rama como covariable, para tomar en cuenta el *stock* de uredosporas disponibles.

Al mismo tiempo se realizó un análisis para la variable cantidad de agua recuperada (mm) en los tratamientos de pleno sol y bajo sombra, en las calles y bajo el cafeto. Para el análisis se utilizaron modelos lineales generales y mixtos y se declaró en la parte fija del modelo, el tratamiento (sombra/sol) y la posición de los recipientes (calles, bajo el cafeto) y su interacción. Como efecto aleatorio se declaró el bloque. El supuesto de normalidad se evaluó usando figuras QQ-plot y la homogeneidad de varianzas mediante diagramas de dispersión de residuos versus predichos. Para evaluar modelos con diferentes funciones de varianzas heterogéneas se usaron los criterios AIC y BIC. La separación de medias se realizó con una prueba de formación de grupos excluyentes DGC (Di Rienzo *et ál.* 2001), con un nivel de significancia  $p < 0,05$ ; a través del uso del software estadístico Infostat (Di Rienzo *et ál.* 2015). Los modelos empleados fueron los siguientes:

$$Y_{\text{esporas/cm}^2_{ijkl}} = \mu + S_i + P_j + SP_{ij} + \beta_k \text{Inóculo}_{ijk} + \beta_l + EE_{ijkl}$$

$$Y_{\text{mm de lluvia}_{ijkl}} = \mu + S_i + P_j + SP_{ij} + B_l + EE_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$ : variable respuesta de la población  
 $\mu$ : media general  
 $S_i$ : efecto del i-ésimo tratamiento (sombra)  
 $P_j$ : efecto de la j-ésima posición  
 $SP_{ij}$ : efecto de la interacción de sombra y posición  
 $B_l \text{E}_{ijl}$ : efecto de la covariable número de esporas  
 $B_l$ : efecto de l-ésimo bloque  
 $EE_{ijkl}$ : término de error del modelo

## 2.10. Análisis estadístico de la deposición de esporas

El análisis de las variables número de esporas/cm<sup>2</sup> de hojas recuperadas por deposición, se realizó mediante modelos lineales generalizados y mixtos. Los efectos fijos fueron el factor sombra, posición y lado de la hoja (haz y envés) y la interacción de los factores. Se declaró el bloque y el efecto de la parcela

principal conteniendo los tratamientos de sombra y la parcela principal conteniendo al tratamiento y a la posición como aleatorios para modelar la estructura del diseño. Se utilizó una distribución de Poisson con enlace Log. La variable número de esporas por rama fue utilizada como covariable en los modelos. La separación de medias se realizó a través del uso del software estadístico Infostat (Di Rienzo et al. 2015), con una prueba de formación de grupos excluyentes DGC (Di Rienzo *et ál.* 2001) con un nivel de significancia  $p < 0,05$ . El modelo empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + L_k + SP_{ij} + SL_{ik} + PL_{jk} + SPL_{ijk} + \beta_1 \text{Inóculo}_{ijl} + B_l + S(B)_{i(l)} + P(S(B))_{j(i(l))} + EE_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$ : variable respuesta de la población  
 $\mu$ : media general  
 $S_i$ : efecto del i-ésimo tratamiento (sombra)  
 $P_j$ : efecto de la j-ésima posición  
 $L_k$ : efecto del k-ésimo lado de la hoja  
 $SL_{ik}$ : efecto de la interacción de sombra y lado de la hoja  
 $SP_{ij}$ : efecto de la interacción de sombra y posición  
 $PL_{jk}$ : efecto de la interacción de posición y lado de la hoja  
 $\beta_1 \text{Inóculo}_{ijl}$ : efecto de la covariable número de esporas  
 $B_l$ : efecto de l-ésimo bloque  
 $S(B)_{i(l)}$ : término del error A  
 $P(S(B))_{j(i(l))}$ : término del error B  
 $EE_{ijkl}$ : término de error del modelo

## 2.11. Análisis estadístico de microclima y la energía cinética de las gotas de lluvia

Se realizó una caracterización del microclima, describiendo el comportamiento promedio de las variables climáticas a lo largo del período evaluado.

Para analizar el efecto de la sombra sobre la energía cinética de las gotas de agua se realizó un análisis de regresión lineal entre las variables de energía cinética de las gotas de lluvia y las horas con lluvia, así como la suma de los cuadrados de las lluvias horarias de las 24 horas anteriores, para observar cuál estaba mejor correlacionado y usarlo como variable. Posteriormente se analizó la energía cinética de las gotas de lluvia mediante modelos lineales generales y mixtos (Di Rienzo *et ál.* 2011), dejando como efecto fijo el tratamiento (sombra/sol) y la mejor de las covariables. En efectos aleatorios se colocó el bloque. Se evaluó la multicolinealidad producida por la inclusión de las dos covariables usando el estadístico VIF (factor de inflación de varianza). El supuesto de normalidad se evaluó usando figuras QQ-plot y la homogeneidad de varianzas mediante diagramas de dispersión de residuos versus predichos. Para evaluar modelos con diferentes funciones de varianzas heterogéneas se usaron los criterios AIC y BIC. La separación de medias se realizó a través del uso del software estadístico Infostat (Di Rienzo et al. 2015), con una prueba de formación de grupos excluyentes DGC (Di Rienzo *et ál.* 2001), con un nivel de significancia  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterización climática del ensayo y de los tratamientos en estudio

La sombra de cashá del ensayo agroforestal del presente estudio, alcanzó un promedio de sombra del 70%, siendo el bloque tres el de mayor porcentaje con un 77%. Estos resultados están por encima de lo recomendado para sombra del café que está entre el 30-55% bien distribuida en el cafetal (Virginio y Domian 2015).

La producción total obtenida de mayo a agosto fue de 251,9 kg de grano en uva a pleno sol y de 7,3 kg bajo la sombra de cashá.

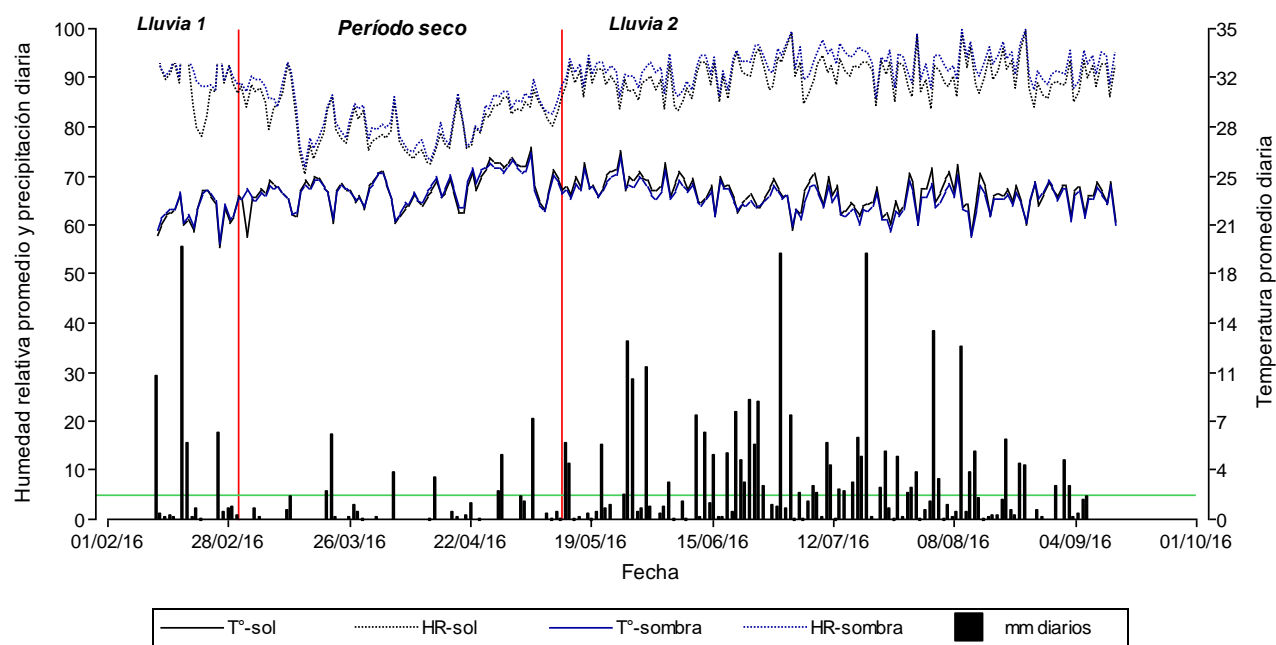
#### 3.2. Resultado de las variables climáticas en relación con esporulación e intensidad de esporulación

Durante el periodo de estudio se pudieron separar dos períodos de altas precipitaciones y uno de baja precipitación. El primer período de precipitaciones altas (Lluvia 1), abarcó desde 1 de enero al 23 de marzo 2016; en total este período acumuló 398,50 mm de lluvia. El segundo correspondió a un “período seco” (23 de marzo al 12 de mayo). El 42% de los días del período seco generalmente mostraron precipitaciones menores a 5 mm diarios, aunque se dieron dos eventos que superaron los 10 mm. En total se acumularon 77,60 mm de lluvia. La humedad relativa promedio fue de 79,7% a pleno sol y 81,1% a la sombra; la temperatura promedio fue de 23,7°C en ambos tratamientos. Es importante observar que la temperatura promedio para este período es 1,5°C mayor al promedio anual general de hace 10 años.

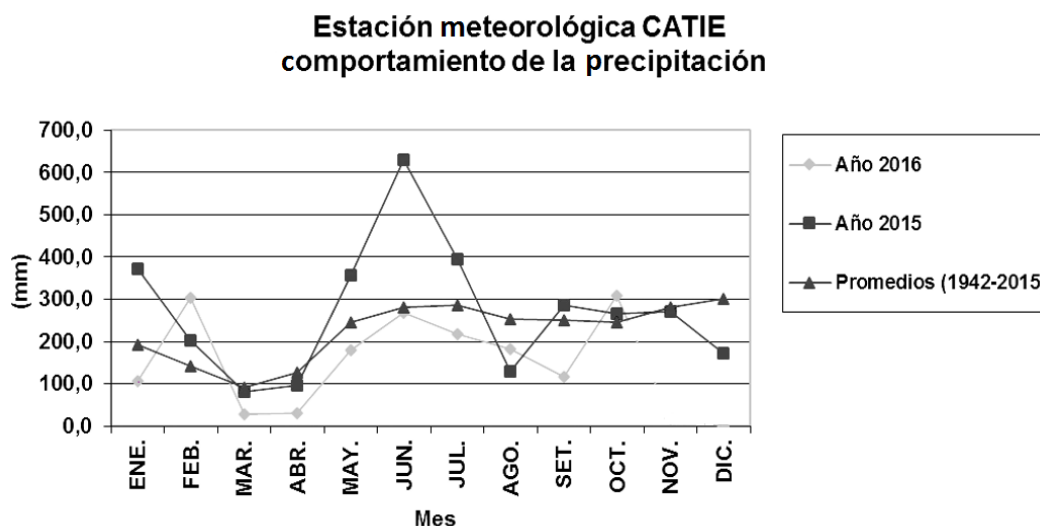
El segundo período de precipitaciones altas (Lluvia 2), se dio del 12 de mayo al 23 de septiembre (cuando terminó la fase de campo de este estudio). Este período presenta precipitaciones más frecuentes y pluviometría diaria abundante con un acumulado de 842,10 mm. A partir de agosto las precipitaciones superan, en su mayoría, los 10 mm diarios (Figura 4 y Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Promedio de temperatura (T°), humedad relativa (HR) y precipitación (mm) en los tratamientos pleno sol y sombra para los períodos de lluvia 1 y 2 y seco observados durante la investigación en el sistema agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica 2016.

Tratamiento	Período	Meses	T (°C)	EE	HR (%)	EE
Sombra cashá	Lluvia 1	Ene-feb	22,60	±0,00	87,86	±0,00
	Lluvia 2	may-sept	22,94	±0,28	92,41	±0,84
	Seco	mar-abr	23,75	±0,27	81,11	±1,87
Pleno sol	Lluvia 1	Ene-feb	22,49	±0,00	85,90	±0,00
	Lluvia 2	may-sept	23,25	±0,27	90,09	±0,71
	Seco	mar-abr	23,74	±0,24	79,77	±1,62



**Figura 4.** Variables microclimáticas y climáticas medidas durante el período de febrero a septiembre del 2016 en el ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Línea de corte color verde en el eje horizontal representa 5 mm de lluvia. Líneas de corte del eje vertical color rojo representan el período seco de abril a mayo de 2016.



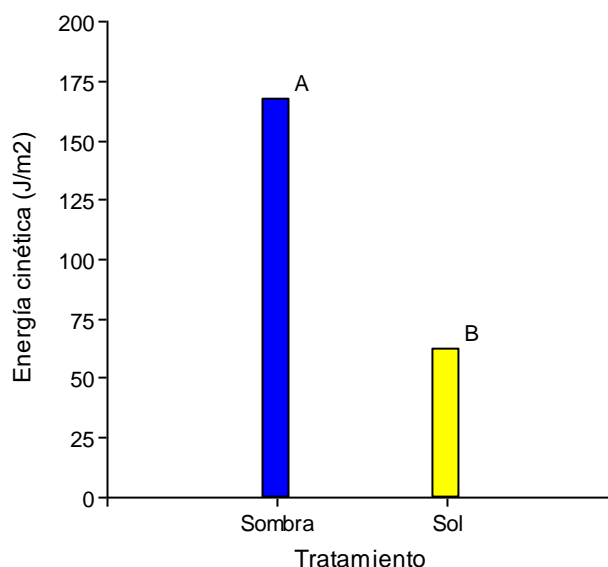
**Figura 5.** Precipitaciones durante el 2015 y 2016 y el promedio calculado desde 1942 al 2016 en CATIE, Turrialba, Costa Rica

En el 2015 se registró una máxima de precipitación de 600 mm en junio; para ese mismo mes, en el 2016 se registraron 257 mm siendo el segundo mes con mayor precipitación observado durante el estudio, ya que febrero alcanzó 268 mm. Es posible observar que hay una reducción considerable en las precipitaciones del 2016 con respecto al año anterior (Figura 5).

**Energía cinética:** La correlación de Pearson mostró un  $r > 0,40$  y fue significativa ( $p < 0,05$ ) para ambas covariables (Cuadro 3). Para evitar multicolinealidad de ambas, se descartó una de las dos con el análisis de regresión lineal que indicó la suma de los cuadrados de las lluvias con un mejor valor VIF ( $< 12$ ) para seleccionarla como covariable. La energía cinética de las gotas de agua depende significativamente ( $p < 0,05$ ) de la suma de los cuadrados de las lluvias horarias de las 24 horas anteriores. Al analizar la diferencia de medias con el modelo para sol y sombra, se observó que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p = 0,0003$ ) siendo mayor la EC bajo sombra ( $167 \text{ J/m}^2$ ) que a pleno sol ( $62 \text{ J/m}^2$ ) (Figura 6).

**Cuadro 3.** Correlación de Pearson de la energía cinética ( $\text{J/m}^2$ ) durante eventos de lluvia registrados a través del uso de *splashcups* con la suma de los cuadrados de las lluvias horarias de las 24 horas anteriores en el ensayo agroforestal del CATIE, Turrialba, Costa Rica

Tratamiento	Variable 2	Pearson	p-valor
Pleno Sol	Horas con lluvia	0,40	0,0159
	Suma de los cuadrados de la lluvia	0,49	0,0030
Sombra cashá	Horas con lluvia	0,40	0,0183
	Suma de los cuadrados de la lluvia	0,43	0,0098



**Figura 6.** Energía cinética de las gotas de lluvia en las parcelas a pleno sol y bajo sombra densa de cashá en el ensayo agroforestal del CATIE, Turrialba, Costa Rica de mayo a agosto 2016

### 3.3. Esporulación por rama e intensidad de esporulación

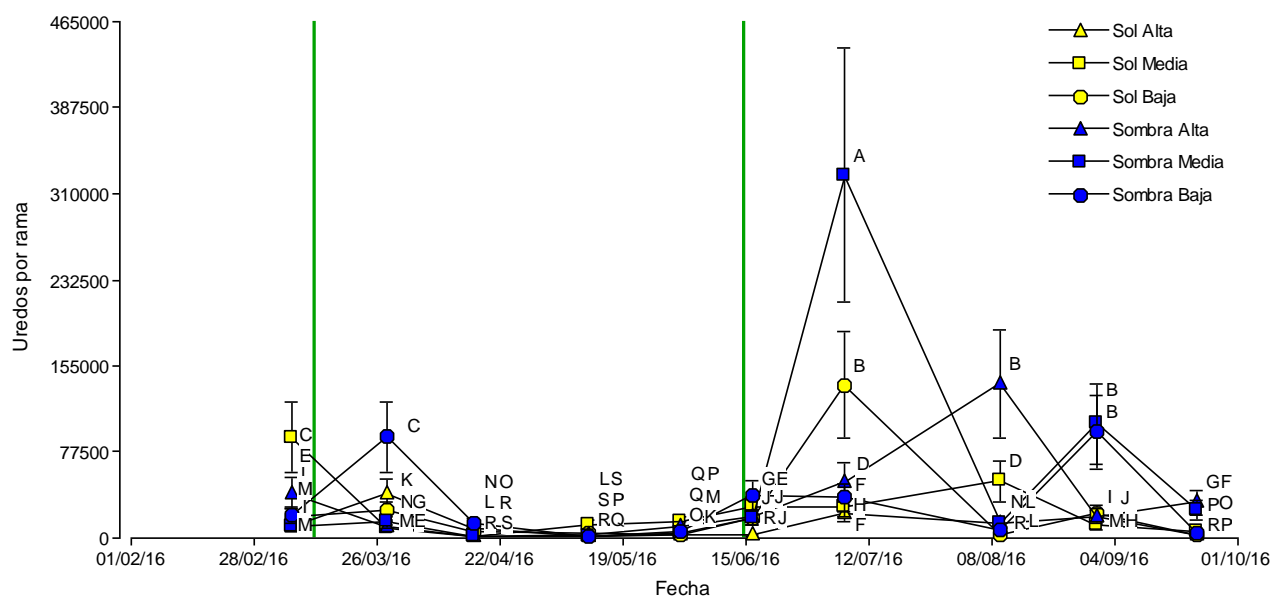
**Esporulación por rama:** El análisis de esporulación por rama no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), para tratamientos a pleno sol ( $10\,472$  uredosporas/rama) y sombra ( $15\,271$  uredosporas/rama). Sin embargo, mostró diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) en la interacción de tratamiento, posición de la rama muestreada (estrato del café) y fechas de muestreo. La esporulación por rama más alta se observó

bajo sombra en el estrato medio del cafeto (julio) con un total del 326 903 uredosporas por rama (Figura 7). En este mismo mes el tratamiento a pleno sol en del estrato bajo del cafeto tuvo también un valor alto de esporulación (137 999 uredosporas/rama), que difiere del anterior.

En agosto se observa una segunda fecha con esporulación por rama con valores altos en el tratamiento de sombra en el estrato alto del cafeto con 138 963 uredosporas por rama. Posterior a esta fecha, los niveles de esporulación siguieron disminuyendo, aunque se mantiene la tendencia a tener más uredosporas bajo sombra del cashá. En septiembre, los niveles de esporulación no difieren entre sí.

Los datos más bajos de esporulación se dieron en abril y mayo en los estratos alto del cafeto para sol y sombra (880 y 1 146 uredosporas/rama respectivamente), y el estrato medio del cafeto para la sombra (1 032 uredosporas/rama). Ambos tratamientos difieren del resto de tratamientos y fechas. Los tratamientos restantes mostraron diferencias entre ellos durante el período de evaluación. Sin embargo, el comportamiento de esporulación se mantuvo igual en la mayoría de las fechas, o aumentaban y disminuían en igual proporción.

Los cambios de esporulación por rama coinciden con los cambios en la precipitación presentados en la Figura 4, pues donde la precipitación aumenta la esporulación también lo hace.

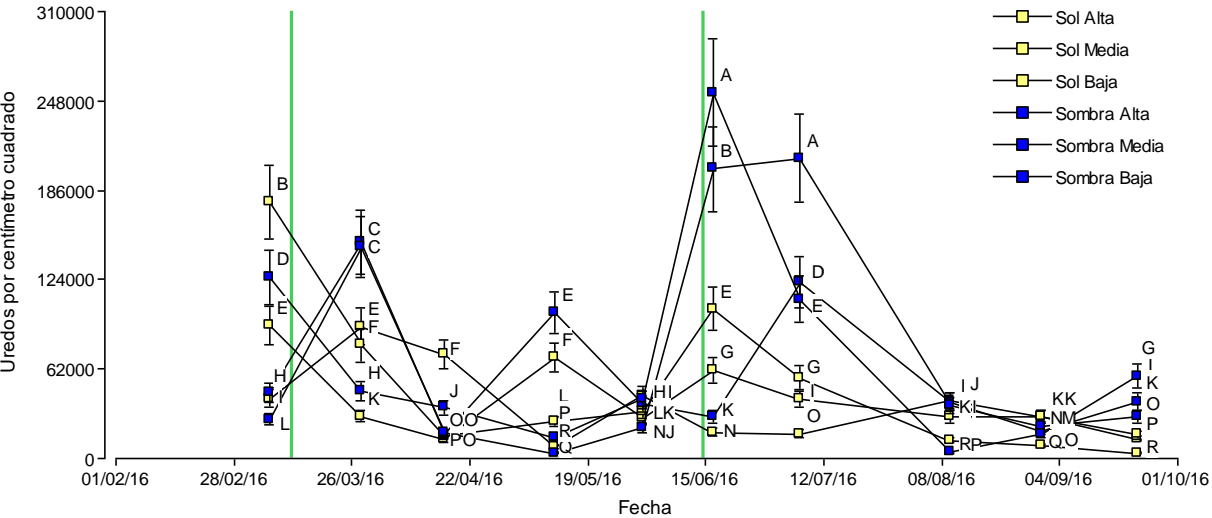


**Figura 7.** Esporulación total por rama durante el período marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra densa de cashá según el estrato de la rama muestreada en el ensayo agroforestal de café, CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC,  $p > 0,05$ ). Las líneas de corte color verde representan las aplicaciones del fungicida Cyprosol® para control de roya. La primera línea corresponde a la aplicación para los tres bloques, la segunda solamente para el bloque uno y dos debido a que en el bloque tres comenzó cosecha

**Intensidad de esporulación:** La intensidad de esporulación es la relación entre la cantidad de esporas y el área con lesiones esporuladas. Para este análisis se encontraron diferencias significativas para tratamientos ( $p=0,0038$ ) y la interacción de tratamientos posición (estrato) de la rama muestreada y fechas de muestreo ( $p<0,001$ ). El tratamiento de sombra presentó un promedio de 41 160 uredosporas/cm<sup>2</sup> en comparación de pleno sol con 30 798 uredosporas/cm<sup>2</sup>. La mayor intensidad de esporulación se

dio en junio y julio en los tratamientos bajo sombra de cashá en los estratos bajos y medio del cafeto respectivamente (Figura 8). Se estimaron promedios de intensidad de esporulación de 253 664 y 208 188 uredosporas/cm<sup>2</sup> bajo sombra y a pleno sol respectivamente; ambos tratamientos difieren del resto.

Las intensidades más bajas se dieron en mayo, agosto y septiembre en los tratamientos bajo sombra de cashá en el estrato medio y bajo del cafeto y en condiciones de pleno sol en el estrato bajo (3407; 3960 y 3558 uredosporas/cm<sup>2</sup> respectivamente). Aunque el resto de tratamientos difieren entre sí, en las diferentes fechas de muestreo, se observa una tendencia de mayor intensidad de esporulación bajo condiciones de sombra. Los promedios de esporulación por rama e intensidad de esporulación en los diferentes estratos del café, muestran que hay una mayor tendencia de presencia de uredosporas en condiciones de sombra densa (Cuadro 4).



**Figura 8.** Intensidad de esporulación por centímetro cuadrado durante el período marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y bajo sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC.*p* >0,05). Las líneas de corte color verde en la figura representa las aplicaciones con el fungicida Cyprosol® para control de roya. La primera línea corresponde a la aplicación para los tres bloques, la segunda solamente para el bloque uno y dos debido a que en el bloque tres comenzó cosecha.

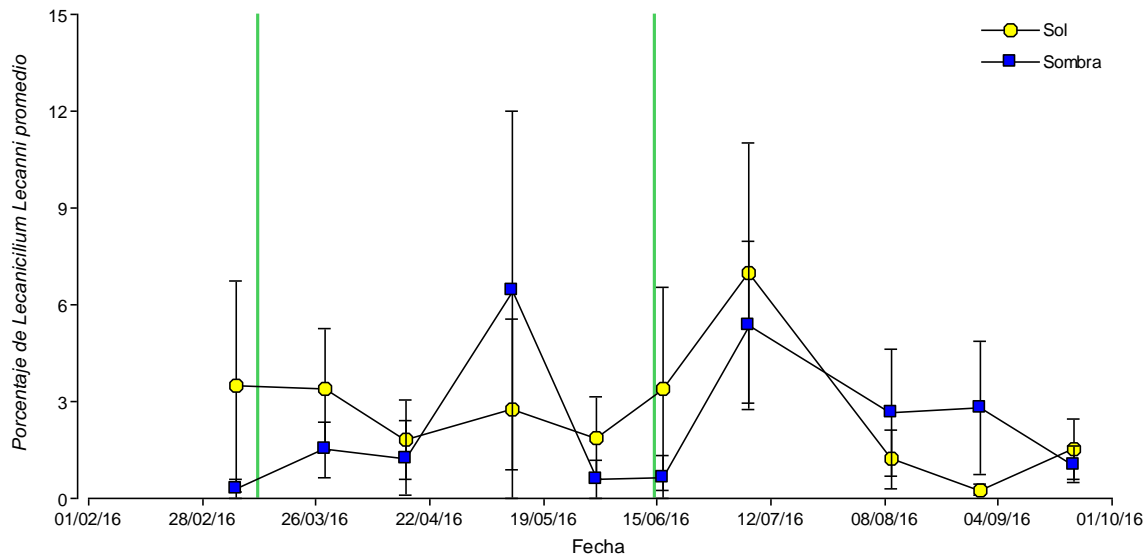
**Cuadro 4.** Promedios de esporulación por rama e intensidad de esporulación por estrato del cafeto muestreado en el sistema agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica 2016

Variable medida	Tratamiento	Estratos del cafeto		
		Alto	Medio	Bajo
Número de esporas por rama	Sol	7 323	14 999	10 456
Intensidad de esporulación	Sol	29 342	34 396	28 946
Esporulación por rama	Sombra densa	16 482	13 313	16 229
Intensidad de esporulación	Sombra densa	46 286	37 002	40713



### Porcentaje de área esporulada con *Lecanicillium lecanii*

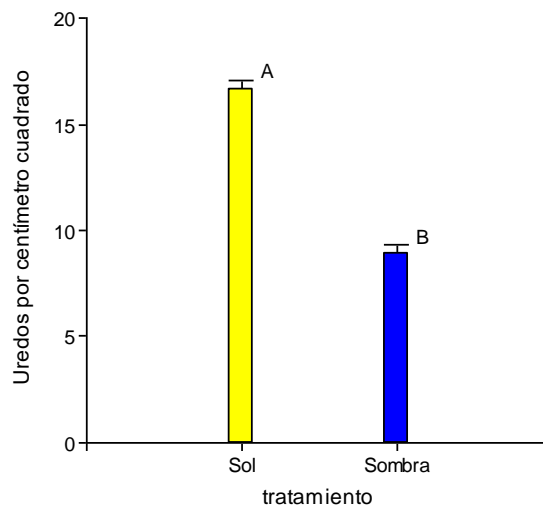
Para el porcentaje de *Lecanicillium lecanii* se determinaron los promedios de los tratamientos a pleno sol y bajo sombra en interacción con la posición (estrato) de la rama del cafeto. En la Figura 9 no se observa un patrón definido de la presencia del hongo en ninguno de los tratamientos debido a la variabilidad que presentó. Asimismo es posible observar que el porcentaje de *L. lecanii* durante el “periodo seco” fue menor al 10%, lo cual coincide con la disminución observada en la esporulación por rama.



**Figura 9.** Porcentaje de área promedio esporulada con *Lecanicillium lecanii* durante el período marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café, CATIE, Turrialba, Costa Rica. Las líneas de corte color verde en la figura representa las aplicaciones con el fungicida Cyprosol® para control de roya. La primera línea corresponde a la aplicación para los tres bloques, la segunda solamente para el bloque uno y dos debido a que en el bloque tres comenzó cosecha.

#### 3.4. Dispersión de las uredosporas a través del lavado por el agua de lluvia

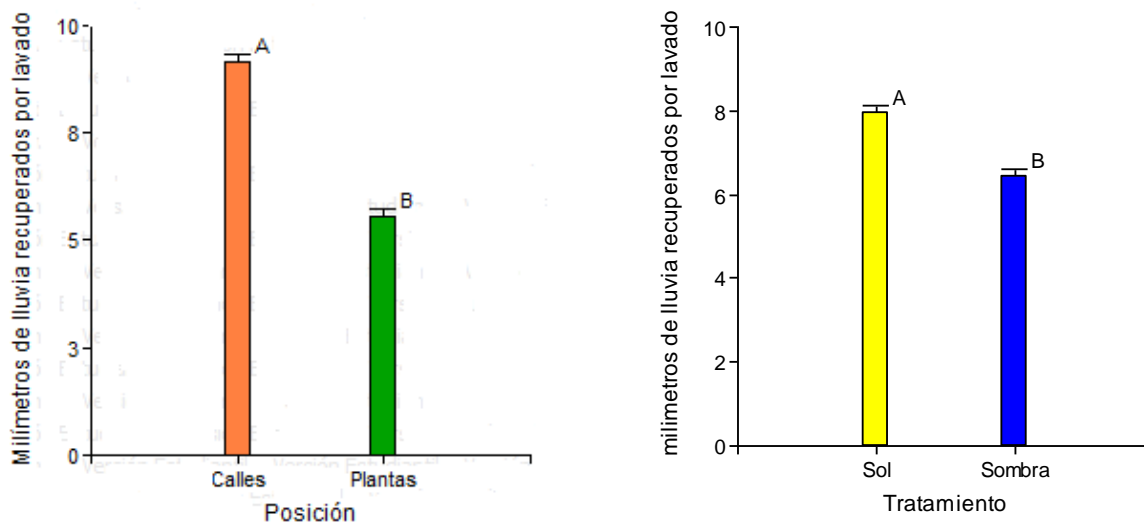
Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos del café a pleno sol y bajo sombra densa de cashá ( $p=0,0195$ ). En pleno sol se encontró un promedio de 16 uredosporas lavadas/cm<sup>2</sup> de terreno en comparación con el tratamiento bajo sombra, donde se encontró en promedio 8 uredosporas lavadas/cm<sup>2</sup> solamente (Figura 10). Este valor es el promedio de lo que se recuperó bajo el cafeto y entre las calles. Además, es 3 veces más al encontrado en el salpique y la deposición. El *stock* de inóculo disponible no explicó el número de esporas recuperadas lavadas.



**Figura 10.** Uredosporas recuperadas por lavado de la lluvia en dos posiciones (bajo el cafeto y en las entrecalles) en el período de marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC. $p > 0,05$ ).

La cantidad de uredosporas recuperadas bajo los cafetos en condiciones de sombra es en promedio 23,1 uredosporas/cm<sup>2</sup> y a pleno sol 9,0 uredosporas/cm<sup>2</sup>. En las entrecalles se recuperaron 14,9 uredosporas/cm<sup>2</sup> en condiciones de pleno sol y 10,9 uredosporas/cm<sup>2</sup> bajo sombra.

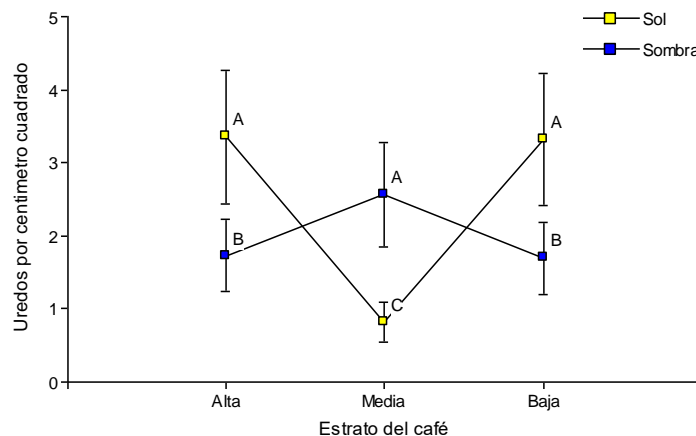
El análisis de la cantidad de agua recuperada también mostró diferencias significativas para el factor sombra (sombra densa de cashá y pleno sol) ( $p=0,0001$ ) y la posición del recipiente, en la calle o bajo el cafeto ( $p<0,0001$ ). El tratamiento a pleno sol tuvo mayor cantidad de agua recuperada que el cultivo bajo sombra. Asimismo los botes colocados en las calles mostraron mayor cantidad de agua recolectada que los que se colocaron debajo de las plantas (Figura 11).



**Figura 11.** Agua de lluvia recuperada por posición de los botes (calles y bajo plantas de café) y por tratamiento (sombra/sol) en el sistema agroforestal del CATIE, Turrialba, Costa Rica 2016. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC. $p > 0,05$ )

### 3.5. Resultado sobre dispersión a través del salpique

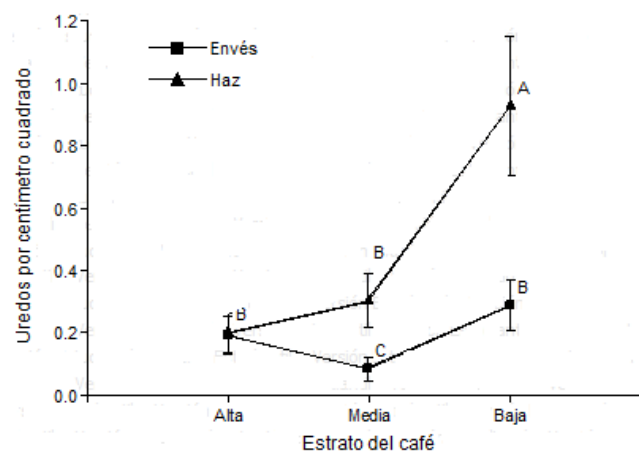
El análisis del número de esporas recuperadas por salpicadura no mostró diferencias significativas para el tratamiento de sombra. Sin embargo, la interacción del estrato del café con la sombra si mostró diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ). Se observaron más esporas dispersadas por salpique a pleno sol en los estratos bajo y alto del cafeto ( $3,2$  uredosporas/cm<sup>2</sup>), así como en el estrato medio del cafeto bajo condiciones de sombra ( $2,5$  uredosporas/cm<sup>2</sup>). Bajo sombra en los estratos bajo y alto del cafeto, así como a pleno sol en el estrato medio, se observaron menos de  $2$  esporas/cm<sup>2</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** Uredosporas dispersadas por salpicadura en diferentes estratos del cafeto (alto, medio y bajo) en el período de marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y bajo sombra densa de cashá del ensayo agroforestal de café, Turrialba, CATIE, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC,  $p > 0,05$ ).

### 3.6. Deposición de las esporas de roya sobre las hojas de la planta de café

El efecto de la sombra sobre la deposición de uredosporas de roya no fue significativo. Sin embargo, la interacción del estrato del cafeto y el lado de la hoja (haz/envés), mostró diferencias significativas ( $p = 0,0140$ ). Lo anterior indica que la deposición depende de ambos factores. En el estrato bajo del café se encontraron más esporas depositadas en el haz de hoja. Existe una tendencia a tener más esporas depositadas especialmente en el haz de la hoja a medida que se baja en los estratos del cafeto (Figura 13).

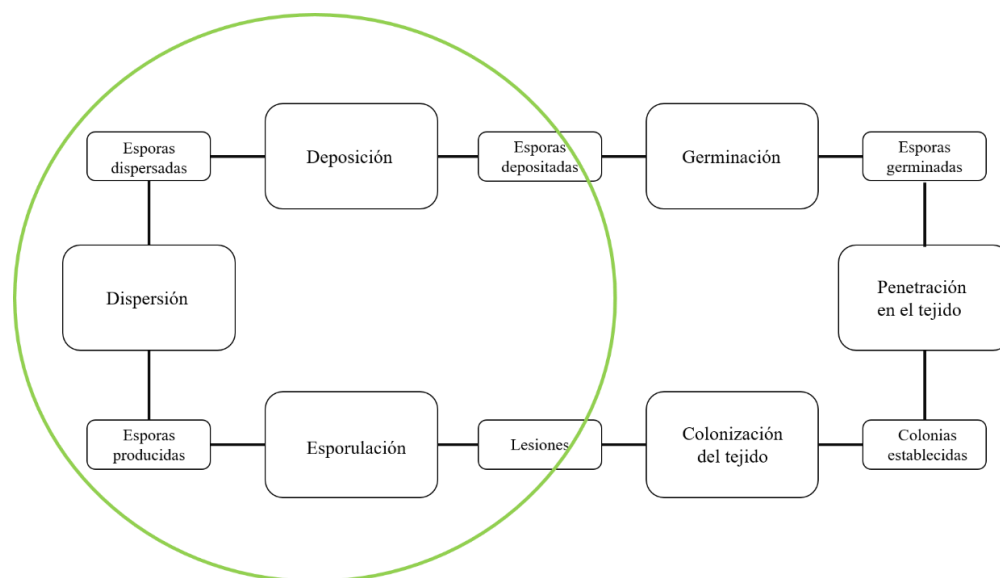


**Figura 13.** Uredosporas recuperadas por deposición en tres estratos del café (alto, medio y bajo) en el período de marzo-septiembre del 2016 en los tratamientos pleno sol y sombra de cashá del ensayo agroforestal de café del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC,  $p > 0,05$ ).

#### 4. Discusión general

La presente investigación complementa el conocimiento del efecto de la sombra sobre el ciclo de desarrollo de la roya sobre el café (Silva-Acuña *et ál.* 1999; Avelino *et ál.* 2006; Pico 2014; Granados 2015; Boudrot *et ál.* 2016). La sombra sobre el cultivo de café genera múltiples beneficios como el reciclaje de nutrientes, regulación del microclima, soporte de la biodiversidad de especies, protección del suelo, regulación de la carga fructífera y puede ser útil bajo escenarios de cambio climático (Acuña *et ál.* 2016). Sin embargo, puede tener efectos no deseados en el desarrollo de la roya. Al evaluar el efecto de la sombra sobre los procesos de esporulación, dispersión a través del agua por lavado de la lluvia y el salpique de las gotas y deposición de la roya en el café, identificamos efectos negativos sobre el desarrollo de la enfermedad. Es difícil establecer una discusión con base en otros ensayos similares en café, ya que esta es la primera vez que se evalúa el efecto de la sombra sobre estos procesos. Sin embargo, estudios sobre los mecanismos de dispersión a través del agua de lluvia con diferentes hongos en condiciones de pleno sol, nos permiten identificar patrones de comportamiento similar al de la roya del café (Hildebrand y Sutton 1984; Fitt *et ál.* 1989; Sosa-Alvarez *et ál.* 1995; Lacey 1996; Anco *et ál.* 2010).

La sombra del café ha sido estudiada principalmente sobre los procesos pre-infecciosos de la roya, favoreciendo la germinación y penetración del hongo (Silva-Acuña *et ál.* 1999; Pico 2014; Granados 2015). Estas etapas se estudiaron a través de la incidencia de la enfermedad. López-Bravo *et ál.* (2012) y Avelino *et ál.* (2006) encontraron incidencias mayores en sistemas de producción bajo sombra. Si bien la sombra favorece los procesos pre-infecciosos de la roya del café, identificamos otras etapas del ciclo que también son favorecidas por la sombra.



**Figura 14.** Diagrama de flujos representando el ciclo de vida de *Hemileia vastatrix*. El círculo verde encierra los procesos estudiados en la presente investigación.

## **Efecto de la sombra sobre la esporulación e intensidad de esporulación**

Las diferencias de esporulación podrían explicarse por diferencias de microclima y especialmente de humedad relativa (Avelino *et ál.* 2006), entre las condiciones de sol y sombra, y también entre los estratos del cafeto. Además, las diferencias se marcan cuando las condiciones climáticas para la esporulación se vuelven más húmedas. Hay fechas en períodos secos, donde la esporulación disminuye y se da un comportamiento igual entre los tratamientos. Cuando hay esporulación, las condiciones de autosombramiento en los estratos bajos a pleno sol se igualan a las condiciones de sombra en ramas altas bajo sombra, lo que explica los niveles de esporulación similares. La esporulación baja a pleno sol se iguala a la esporulación en ramas altas de la sombra de cashá. El efecto de las condiciones sombreadas en el incremento de la cantidad de esporas producidas, podría ser un efecto indirecto a través del incremento de la incidencia de roya (López-Bravo *et ál.* 2012) y de la colonización de la hoja. Brenes (2016), demostró que el área foliar afectada bajo sombra es superior a la del pleno sol. Esto se explica en parte por el incremento de la incidencia de roya bajo sombra y también por una duración de vida de las hojas más larga en esta condición de luminosidad, lo que permite a las lesiones crecer más.

Las esporulaciones por rama más altas, coincidieron con los períodos de precipitación mayores; caso contrario, el período categorizado como “período seco”, presentó las menores esporulaciones. Similares resultados fueron obtenidos por Boudrot *et ál.* (2016), quienes también diferenciaron un “período seco” y observaron que las esporulaciones en ramas más bajas coincidieron con este período. Las esporulaciones más altas coincidieron con las precipitaciones altas registradas durante su investigación. Sin embargo, en esta investigación no se reportó el efecto de la sombra sobre la esporulación.

La sombra incrementó también el número de esporas producidas por área foliar esporulada (intensidad). A diferencia de la esporulación por rama, se obtuvieron diferencias significativas para el factor sombra y de la interacción entre este, el estrato del cafeto y la fecha de muestreo. La mayor intensidad de esporulación bajo sombra nos permitió deducir que hay una influencia directa de las condiciones sombreadas en el proceso de esporulación.

Al igual que otros autores, nosotros sugerimos que hay condiciones favorables de clima, posiblemente de humedad relativa alta y temperaturas más estables, que favorecen la esporulación de la roya, tal como se ha estudiado en otros patógenos como *Phonopsis viticola*, *Botrytis cinerea* y *Peronospora destructor* (Hildebrand y Sutton 1984; Sosa-Alvarez *et ál.* 1995; Anco *et ál.* 2010). También podría existir un efecto sobre la apertura o cierre de estomas, por efectos de temperatura ambiental, temperatura de la hoja o intensidad lumínica (Mahotiere 1967), que permiten a la planta impedir más esporulación a pleno sol que bajo sombra. A nuestro conocimiento, nuestros resultados serían los primeros registros del efecto de la sombra sobre la esporulación de la roya del café.

## **Efecto de la sombra sobre la dispersión a través del agua por medio del salpique y lavado de esporas**

La sombra puede generar efectos positivos o negativos sobre la etapa de dispersión de uredosporas de roya. Este efecto puede ser diferente de acuerdo al medio de dispersión, factores bióticos como la fauna, factores de manejo (Avelino *et ál.* 2004), factores abióticos como el aire (Brenes 2016) o por medio del agua con los mecanismos de salpique y lavado por la lluvia. Nuestros resultados no reflejan un efecto puro de la sombra sobre la dispersión por salpique, sino el efecto de la interacción con el estrato de la planta del café. Sin embargo, la tendencia es que se tenga mayor dispersión por salpique al sol;

aunque hacen falta más datos para tener resultados más definitivos. Lo observado podría deberse al incremento de la energía cinética de las gotas de agua bajo sombra. La cantidad de agua recuperada en sombra, bajo los cafetos es de 2,5 mm inferior a la cantidad de agua recuperada al sol bajo los cafetos. Sin embargo, la diferencia entre sombra y sol en la calle es de sólo 1,2 mm. Esto sugiere que las gotas de agua bajo sombra no son interceptadas por los cafetos tanto como a pleno sol. Cuando las gotas tienen mayor energía cinética rebotan sobre el follaje del café siendo recuperadas en la calle. Una menor interceptación de las gotas de agua significa que la superficie de las hojas bajo sombra podría mantenerse menos húmeda que al sol cuando llueve, evitando el proceso de *splashing* (Fitt *et ál.* 1989). Hay evidencias de que la interceptación del agua por el follaje es mayor cuando las gotas son más pequeñas (Calder, 1996), lo que está a favor de esta interpretación.

La forma de dispersión de la roya por salpique parece ser efectiva. Las cantidades de esporas recuperadas son de 3/cm<sup>2</sup> en promedio aproximadamente. Boudrot *et ál.* (2016), al medir la dispersión en el aire, sólo recuperaron un máximo de 32 esporas por m<sup>3</sup> de aire. Aunque ambas formas de dispersión son posibles (Kushalappa y Eskes 1989), nuestro estudio es el primero en cuantificar la dispersión por salpique y evaluar el efecto de las sombra sobre este proceso.

Asimismo, se observó que hay un mayor número de esporas lavadas en el tratamiento a pleno sol que en el de sombra. Se deduce que la lluvia en este caso no es un factor de dispersión para la enfermedad, sino más bien un mecanismo de regulación (Fitt *et ál.* 1989). La sombra intercepta el agua de lluvia (Imbach *et ál.* 1989; Jaramillo *et ál.* 1998), efecto que ya se había demostrado, lo que explica que menos agua llegue al cafeto. También explicamos que la interceptación del agua por el follaje del cafeto es menor bajo sombra que a pleno sol por mayor energía cinética de las gotas de agua bajo sombra. Bajo sol, por lo contrario, se acumula más agua en las hojas y tallos que luego escurre y lava las esporas hasta remover la mayor cantidad de inóculo, aunque siempre dependiendo de la intensidad de la lluvia (Lacey 1996). El efecto de lavado de esporas para hongos biotróficos puede limitar grandemente el progreso de la epidemia como fue explicado por Savary *et ál.* (2004), pues una espora lavada es una espora que no puede causar infección.

El promedio de esporas producidas por rama bajo sol y sombra es de 10 472 y 15 271 uredosporas/bandola respectivamente. El número de bandolas y pisos (Blanco *et ál.* 2003), que una planta de café regularmente puede desarrollar es de 80-100 bandolas aproximadamente. Así, a pleno sol calculamos que hay 800 mil uredosporas aproximadamente producidas por planta y bajo sombra 1,2 millones. La cantidad de esporas recuperadas por lavado solamente en las plantas a pleno sol se estiman en 261 690 uredosporas (suponiendo que la planta ocupa 1m<sup>2</sup> de área), lo cual representa el 33% del total de uredosporas producidas que se pierden por cafeto en promedio en cada evento lluvioso. Bajo sombra se estima solamente un lavado del 8% de uredosporas, lo que equivale a una tercera parte de lo que se lava a pleno sol. Por lo anterior se deduce que la sombra no permite el lavado del inóculo como lo hace el efecto de la lluvia a pleno sol, permitiendo así que las uredosporas permanezcan en la planta en mayor cantidad.

A nuestro conocimiento no se han encontrado investigaciones similares del efecto de la sombra sobre lavado de esporas de la roya del café. Sin embargo, investigaciones realizadas por Savary y Janeau (1986) con la roya del maní (*Puccinia arachidis*), demuestran igualmente como la lluvia facilita el

lavado. Con nuestra investigación se logra demostrar que la sombra conserva el inóculo en las plantas de café y que la lluvia incrementa la pérdida del inóculo.

### **Efecto de la sombra sobre la deposición de uredosporas en las hojas del café**

Para que exista infección de la roya en el café, las uredosporas deben ser depositadas en el envés de las hojas, ya que la infección se realiza a través de los estomas, y no en el haz (Guggenheim y Harr 1978). Los resultados obtenidos indican que el nivel de sombra no es un factor que explique la deposición. Sin embargo, se observó una interacción en el estrato del café y el lado de las hojas, dando como resultado que hay un mayor número de esporas depositadas en los estratos bajos y en el haz de las hojas.

Tal como se mencionó anteriormente, esto se debe a que posterior a un evento de lluvia, las esporas lavadas a través de la planta se depositan por medio de la gravedad en los estratos inferiores, quedando atrapadas en gotas o en el agua suspendida sobre las hojas (Lacey 1996). El agua llovida arrastra esporas que finalmente quedan depositadas en menor medida en el envés y que posiblemente se depositan también con gotas que logran deslizarse del haz hasta el lado inferior de la hoja.

### **Efecto de la sombra sobre la roya**

Con nuestros resultados se está complementando la información existente sobre el ciclo de la roya en el café (Avelino *et ál.* 1999; López-Bravo *et ál.* 2012; Avelino y Rivas 2013; Pico 2014). Se demuestra que la sombra mayormente favorece varios de los procesos del desarrollo de la roya (Cuadro 5). Esto no sugiere que la sombra sea perjudicial para el desarrollo de café, ya que como se mencionó anteriormente, la sombra también genera beneficios (López-Bravo *et ál.* 2012; Villarreyna *et ál.* 2016). Además, la sombra tiene efectos distintos sobre la roya, pero a través de la planta del café. Por ejemplo, la sombra regula la carga fructífera lo cual reduce las incidencias de la roya (López-Bravo *et ál.* 2012); también incrementa la duración de vida de las hojas infectadas (Brenes 2016), lo cual permite a las ramas sobrevivir más fácilmente a los ataques de roya que a pleno sol, reduciendo así las pérdidas (Avelino *et ál.* 2015). Es necesario recalcar que, para nuestro estudio, el porcentaje sombra era alto; lo cual hace relevante que se evalúen diferentes porcentajes de sombra para tener una conclusión más certera sobre su efecto en la roya.

Esta investigación nos da elementos importantes para buscar rasgos de las plantas utilizadas como sombra que permitan reducir los efectos negativos ocasionados por la misma como: la canalización del agua en el dosel, el incremento de la energía cinética de las gotas de lluvia, menor intercepción del agua por el cafeto durante eventos de lluvia. La forma de las hojas (recortadas), su rigidez (flexibilidad), la altura de los árboles (pequeños), podrían ser elementos a considerar para limitar el desarrollo de la roya. También podríamos sugerir sombras manejables que favorezcan el paso de agua durante las lluvias y que permitan el lavado del inóculo, disminuyendo el efecto de la roya sobre el café.

**Cuadro 5.** Cuadro resumen de los efectos bajo los tratamientos de pleno sol y sombra en cada uno de los procesos del ciclo de la roya

Proceso	Sol	Sombra	Mecanismo	Autores
Susceptibilidad	+	-	Sombra	Carvalho <i>et ál.</i> 2001
Incidencia (información)	-	+	Sombra	Staver <i>et ál.</i> 2001; López <i>et ál.</i> 2012; Avelino <i>et ál.</i> 2006
Colonización	=	=	Sombra	Brenes 2016
Área con roya	-	+	Sombra	Brenes 2016
Esporulación por rama	-	+	Sombra	Pico 2014; Granados 2015
Intensidad de esporulación	-	+	Sombra	Presente investigación
Dispersión en aire (lluvia)	-	+	Lluvia	Boudrot <i>et ál.</i> 2016; Brenes 2016; Pico 2014
Dispersión en aire (seco)	+	-	Viento	Boudrot <i>et ál.</i> 2016; Brenes 2016; Pico 2014
Dispersión por <i>splashing</i>	=	=	EC	
Conservación de esporas	-	+	Lavado	Presente investigación
Deposición	=	=	Lavado y salpique	

## 5. Conclusiones generales

- La sombra en interacción con los estratos del café, incrementa la esporulación por rama e intensidad de esporulación en relación con las temperaturas estables y humedad relativa más alta bajo sombra.
- La sombra no tiene efectos sobre la dispersión a través del salpique. Sin embargo, la interacción de la sombra con los estratos del café, sí tiene efectos en la dispersión de esporas por este mecanismo. Se propone continuar con las observaciones para confirmar y aclarar este efecto.
- La sombra reduce la dispersión de esporas a través del lavado en relación con la menor intercepción de agua por el cafeto bajo sombra.
- La sombra no tiene efectos sobre la deposición de las esporas. Sin embargo, los estratos del café y el lado de la hoja en interacción, sí muestran un efecto sobre la deposición de las uredosporas de *Hemileia vastatrix*. El lavado de uredosporas las arrastra por gravedad en las partes bajas del cafeto y particularmente en haz de las hojas.

## 6. Recomendaciones

- Estudiar el efecto de diferentes porcentajes de sombra sobre la dispersión de roya a través del agua por medio de los mecanismos de salpique y lavado.
- Estudiar el efecto de la sombra sobre la dispersión a través de mecanismos como el salpique de las gotas de lluvia y el lavado en árboles de sombra con menor altura como el poró.
- Para entender mejor el mecanismo del salpique de las gotas de lluvia se recomienda evaluar la intensidad de la EC y el microclima en cada uno de los estratos de la planta del café, para determinar los factores que intervienen directamente en este mecanismo.



## Referencias

- Agrios, GN. 2005. Plant pathology. United States of America, Elsevier Academic Press. 952 p.
- Alvarado, AS; Rojas, RC. 1994. Cultivo y beneficiado del café. San José, Costa Rica, EUNED. 184 p.  
Disponible en [https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=15qrSG-5114C&oi=fnd&pg=PR7&dq=taxonomia+del+cafe&ots=Oe04r6SaaN&sig=aq-1a9Sw48xQibeyxg4p7C9iL7U&redir\\_esc=y#v=onepage&q=taxonomia%20del%20cafe&f=false](https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=15qrSG-5114C&oi=fnd&pg=PR7&dq=taxonomia+del+cafe&ots=Oe04r6SaaN&sig=aq-1a9Sw48xQibeyxg4p7C9iL7U&redir_esc=y#v=onepage&q=taxonomia%20del%20cafe&f=false)
- Anco, D; Madden, L ; Ellis, M. 2010. Effects of temperature and wetness duration on the sporulation rate of *Phomopsis viticola* on infected grape canes. Plant disease 97(5):579-589.
- Avelino, J; Muller, R; Cilas, C; Velasco Pascual, HV. 1991. Development and behavior of coffee orange rust *hemileia vastatrix* berk and br in plantations undergoing modernization planted with dwarf varieties in southeast Mexico. Café Cacao The 35(1):21-37.
- Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacreo, R; Holguin, F; Bertrand, B; Rapidel, B. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. In Benoit, B; Rapidel, B. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica, IICA. p. 194-241.
- Avelino, J; Willocquet, L; Savary, S. 2004. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. Plant Pathology 53(5):541-547.
- Avelino, J; Zelaya, H; Merlo, A; Pineda, A; Ordoñez, M; Savary, S. 2006. The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. Ecological Modelling 197(3-4):431-447.
- Avelino, J; Ten Hoopen, GM; DeClerck, F. 2011. Ecological mechanisms for pest and disease control in coffee and cacao agroecosystems of the neotropics. In Rapidel, B; DeClerck, F; Le Coq, J-F; Beer J. Ecosystem Services from Agriculture and Agroforestry Measurement and Payment. London, Earthscan. p.91-117.
- Avelino, J; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. HAL archives-ouvertes 47. Disponible en [https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/file/LA\\_ROYA\\_ANARANJADA\\_DEL\\_CAFETO\\_V1.pdf](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/file/LA_ROYA_ANARANJADA_DEL_CAFETO_V1.pdf)
- Avelino, J; Cristancho, M; Georgiou, S; Imbach, P; Aguilar, L; Bornemann, G; Läderach, P; Anzueto, F; Hruska, AJ; Morales, C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. Food Security 72:303-321.
- Barquero, MM. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto. Tercera ed. San José, Costa Rica, ICAFE. 63 p.
- Barrance, A; Cordero, J; Boshier, D. 2003. Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. s.l. OFI/CATIE. 1079 p.
- Blanco, M. 1984. Cultivos industriales. El café. Managua, Nicaragua, Universidad Nacional Autónoma.
- Bock, K. 1962. Dispersal of uredospores of *Hemileia vastatrix* under field conditions. Transactions of the British Mycological Society 45(1):63-74.
- Boudrot, A; Pico, J; Merle, I; Granados, E; Tixier, P; Vilchez, S; Virginio Filho, E; Casanoves, F; Tapia, A; Allinne, C; Rice, R ; Avelino, J. 2016. Shade Effects on the Dispersal of Airborne *Hemileia vastatrix* Uredospores. Phytopathology: 106(6), 572-580.
- Brenes, LMA. 2016. Efectos de la sombra de cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) sobre los procesos de colonización, esporulación y dispersion aerea de la roya (*Hemileia vastatrix*) sobre plantas de café (*Coffea arabica*) en la zona de Turrialba. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE.

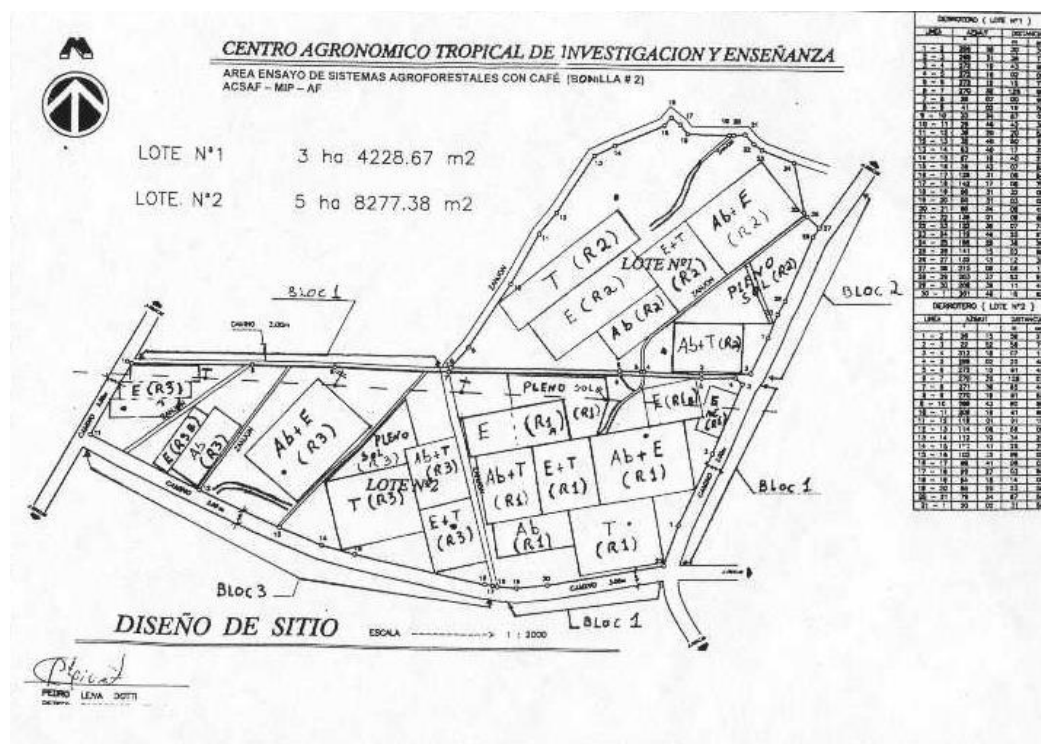
- Calder, IR. Dependence of rainfall interception on drop size: 1. Development of the two-layer stochastic model. *Journal of Hydrology* 185(1-4):363-378.
- Cannell, MRG. 1985. Physiology of the coffee crop. In *Coffee* ). Springer US. p. 108-134
- Carvalho, CR; Fernandes, RC; Carvalho, GMA; Barreto, RW ; Evans, HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS One* 6(11):e26387. doi:10.1371/journal.pone.0026387
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2016. Estación Meteorológica CR, Centro Agrícola Tropical de Investigación y Enseñanza (en línea). Consultado 26 set. 2015. Disponible en <http://www.catie.ac.cr/es/productos-y-servicios/estacion-meteorologica>.
- CERLOMICS 2016. Fórmula de la Cámara de Neubauer. Cálculos en la Cámara de Neubauer (en línea). Consultado 30 nov. 2015. Disponible en <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion.php>. Revisado el: 30 noviembre 2015.
- Coutinho, T; Rijkenberg, F ; Van Asch, M. 1993. Appressorium formation by *Hemileia vastatrix*. *Mycological Research* 97(8):951-956.
- Chalfoun, S; Zambolim, L. 1985. Ferrugem do cafeeiro. *Informe Agropecuario (Brasil)* 11(126): 42-46.
- De Jong, E; Eskes, A; Hoogstraten, J; Zadoks, J. 1987. Temperature requirements for germination, germ tube growth and appressorium formation of urediospores of *Hemileia vastatrix*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 93(2):61-71.
- Evans, HC. 1993. Studies on the rust *Maravalia cryptostegiae*, a potential biological control agent of rubber-vine weed (*Cryptostegia grandiflora*, Asclepiadaceae: Periplocoideae) in Australia, I: Life-cycle. *Mycopathologia* 124(3):163-174.
- Evenhuis, A; Verdam, B; Zadoks, J. 1997. Splash dispersal of conidia of *Mycocentrospora acerina* in the field. *Plant Pathology* 46:459-469.
- Fernandes, RdC; Evans, HC; Barreto, RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology* 34(2):108-113.
- Figueiredo, M; Passador, M. 2008. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo* 75(1):117-134.
- Fitt, BD; McCartney, H; Walklate, P. 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology* 27:241-270.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227.
- Granados, BE. 2015. Evaluación de la incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en plantas de café bajo diferentes intensidades de sombra y estrategias de manejo. Thesis Lic.. Turrialba Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 74 p.
- Guggenheim, R; Harr, J. 1978. Contributions to the Biology of *Hemileia vastatrix* II. SEM - Investigations on Sporulation of *Hemileia vastatrix* on Leaf Surfaces of *Coffea arabica*. *Journal of Phytopathology* 92(2):97-101.
- Hildebrand, P; Sutton, J. 1984. Relationships of temperature, moisture, and inoculum density to the infection cycle of *Peronospora destructor*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 6(2):127-134.

- Hindorf, H ; Omondi, CO. 2011. A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of Advanced Research* 2(2):109-120.
- ICAFFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2014. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica San Jose, Costa Rica. Consultado 20 de octubre 2015 Disponible en [http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/congresos\\_cafetaleros/2014/InformeActividadCafetalera2014.pdf](http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/congresos_cafetaleros/2014/InformeActividadCafetalera2014.pdf)
- Imbach AC, Fassbender HW, Beer J, Borel R, Bonnemann A, 1989. Sistemas agroforestales de café (*Coffea arabica*) con laurel (*Cordia alliodora*) y café con poró (*Erythrina poeppigiana*) en Turrialba, Costa Rica. 6. Balances hídricos e ingreso con lluvias y lixiviación de elementos nutritivos. Turrialba 39, 400–14.
- Jaramillo-Robledo A, Chaves-Córdoba B, 1998. Interceptación de la lluvia en un bosque y en plantaciones de *Coffea arabica* L. *Cenicafé* 49: 129–34.
- Kushalappa, A; Akutsu, M; Ludwig, A. 1983. Application of survival ratio for monocyclic process of *Hemileia vastatrix* in predicting coffee rust infection rates. *Phytopathology* 73:96-103.
- Kushalappa, AC; Eskes, AB. 1989. Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology* 27:503-531.
- Lacey, J. 1996. Spore dispersal—its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology. *Mycological Research* 100(6):641-660.
- López-Bravo, D; Virginio, FEDM; Avelino, J. 2012. Shade is conducive to coffee rust as compared to full sun exposure under standardized fruit load conditions. *Crop Protection* 38:21-29.
- McCain, J; Hennen, J. 1984. Development of the uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. *Phytopathology* 74:714-721.
- McCook, S. 2009. La roya del café en Costa Rica: Epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista de Historia* 59-60:99-117.
- Merlo, CM. 2007. Comportamiento productivo del café (*Coffea arabica* var caturra), el poró (*Erythrina poeppigiana*) el amarillón (*Terminalia amazonia*) y el cashá (*Chloroleucon* sp.) en sistemas agroforestales bajo manejos convencionales y orgánicos en Turrialba, Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE.
- Phillips-Mora, W; Cawich, J; Garnett, W; Aime, M. 2006. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathology* 55:584.
- Pico, RJT. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 79 p.
- Rajendren, RB. 1967. A new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. *Mycologia* 59(2):279-285.
- Rojo, JE; Pérez, UCE. 2014. Café I (G. *Coffea*). *Reduca (Biología)*. Serie Botánica 7(2):113-132.
- Saccas, AM. 1971. La rouille des cafeiers due a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. *Bulletin-Institut Francais du Café et du Cacao* no. 10: 123 p.
- Savary, S; Janeau, J-L. 1986. Rain-induced dispersal in *Puccinia arachidis*, studied by means of a rainfall simulator. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 92(4):163-174.

- Savary S, Janeau JL, Allorement D, Escalante M, Avelino J, Willocquet L. 2004. Effects of simulated rainfall events on spore dispersal and spore stocks in three tropical pathosystems. *Phytopathology*. 94(6):S92-S
- Scholten, T; Geißler, C; Goc, J; Kühn, P ; Wiegand, C. 2011. A new splash cup to measure the kinetic energy of rainfall. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174(4):596-601.
- Schroth, G; Krauss, U; Gasparotto, L; Aguilar, JD ; Vohland, K. 2000. Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics. *Agroforestry Systems* 50(3):199-241.
- Silva-Acuña, R; Maffia, L; Zambolim, L ; Berger, R. 1999. Incidence-severity relationships in the pathosystem *Coffea arabica-Hemileia vastatrix*. *Plant Disease* 83(2):186-188.
- Silva-Acuña, R; Rosales Mondragón, M ; Tenías Tenías, J. 2000. Aspectos fisiológicos del café: su influencia en el ataque de la roya. FONAIAP DIVULGA. VE 68:44.
- Silva, M; Guerra-Guimarães, L; Loureiro, A; Nicole, M. 2008. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72(1-3):29-38.
- Sosa-Alvarez, M; Madden, L ; Ellis, M. 1995. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease* 79:609-615.
- Soto, PL; Perfecto, I; Caballero, NJ. 2002. Shade over coffee: its effects on berry borer, leaf rust and spontaneous herbs in Chiapas, Mexico. *Agroforestry Systems* 55(1):37-45.
- Staples, RC. 2000. Research on the rust fungi during the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology* 38:49-69.
- Staver, C; Guharay, F; Monterroso, D; Muschler, RG. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agroforestry Systems* 53(2):151-170.
- Villarreyna, R; Van den Meersche, K; Rapidel, B ; Avelino, J. 2016. Efecto de los árboles de sombra sobre el suelo, en sistemas agroforestales con café, incluyendo la fenología y fisiología de los cafetos.
- Virginio, FEdM; Hagggar, JP ; Staver, CP. 2002. Avances y desafíos en el establecimiento de ensayo de largo plazo en sistemas agroforestales en café en zona baja húmeda Turrialba, Costa Rica. In II Encuentro de Investigadores en Producción Orgánica (11-13 marzo, Turrialba, Costa Rica). Disponible en: [https://www.catie.ac.cr/attachments/article/638/2002-VIRGINIO%20FILHO%20ET%20AL-Avances%20y%20desafios%20Ensayo%20SAF\(IIEncInvProOrgCATIE\).pdf](https://www.catie.ac.cr/attachments/article/638/2002-VIRGINIO%20FILHO%20ET%20AL-Avances%20y%20desafios%20Ensayo%20SAF(IIEncInvProOrgCATIE).pdf)
- Virginio, FEdM ; Domian, CA. 2015. Prevención y control de la roya del café. Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 96 p. (Serie Técnica. Manual Técnico no. 131).
- Voegelé, RT; Hahn, M; Mendgen, K. 2009. The uredinales: cytology, biochemistry, and molecular biology. In Deising, HB (ed.). *The Mycota*. Berlin, Germany, Springer. p. 69-98.
- Wayne Rasband. 1997. Image J for Windows, version 1.5i. National Institutes of Health. Disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Zuluaga, CM; Céspedes, PB; Marín, MM. 2008. Generalidades de los Uredinales (*Fungi: Basidiomycota*) y de sus relaciones filogenéticas. *Acta biol. Colomb.* 14(1):41-56.

## 7. Anexos

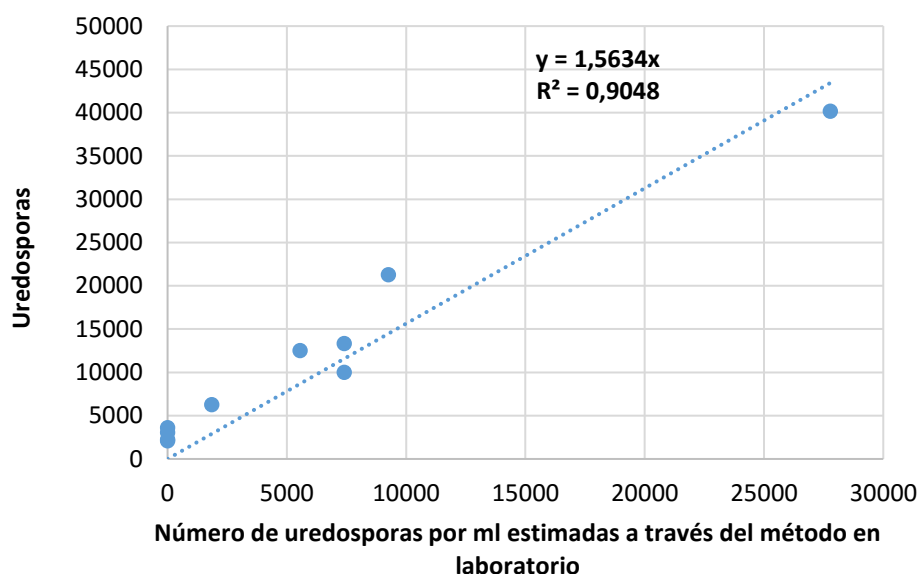
**Anexo 1.** Croquis del ensayo (Ab= sombra densa cashá y pleno sol) agroforestal de café en CATIE, Turrialba, Costa Rica 2016



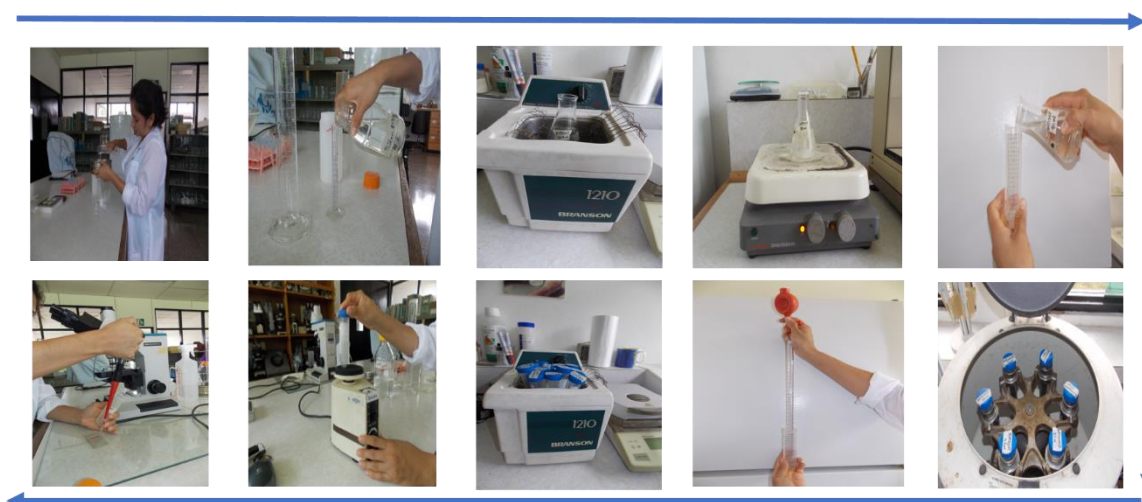
**Anexo 2.** Diagrama de la metodología utilizada para evaluar el número de esporas recuperadas a través del salpique de las gotas de lluvia. De izquierda a derecha en dirección de la flecha, se coloca el papel filtro dentro del tubo de centrífuga, luego se coloca agua con surfactante hasta 45 ml del tubo, se centrifuga durante 2 minutos a 2 500 rpm, se eliminan 35 ml de la superficie del tubo, pasa por el ultrasonificador durante cinco minutos y posteriormente se mezcla y se cuentan las uredosporas con el uso del microscopio y la cámara de Neubauer.



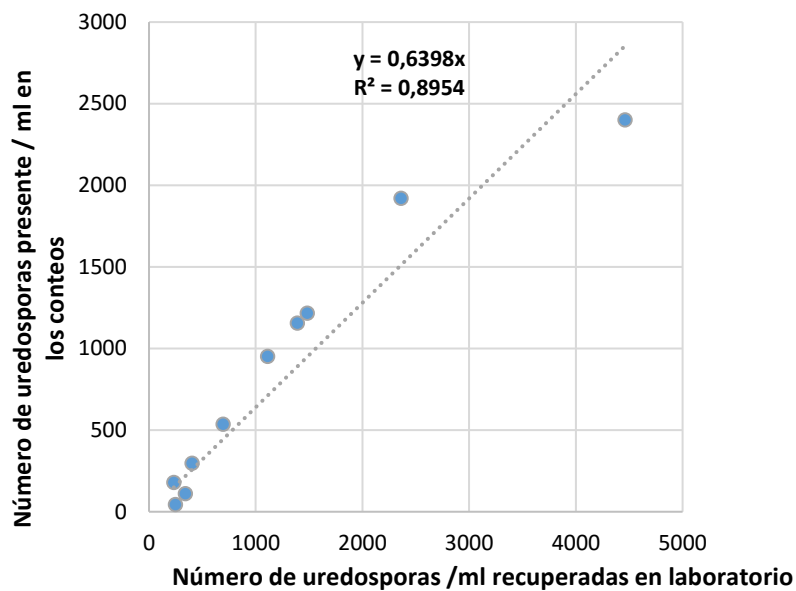
**Anexo 3.** Calibración de la metodología utilizada para el conteo de uredosporas a través de salpique. Correlación entre el número de uredosporas por mililitro de agua inicial y el número de uredosporas recuperadas en laboratorio.



**Anexo 4.** Diagrama de metodología utilizada para evaluar el número de esporas recuperadas del lavado de uredosporas a través de la lluvia. De izquierda a derecha en dirección de las flechas: medición del volumen de la muestra, se le coloca surfactante, durante 5 minutos se coloca en el ultrasonificador, luego se vierte la muestra en tubos de centrifuga, posteriormente se centrifuga durante 3 minutos a 2 500 rpm, se eliminan 40 ml del volumen del tubo, se mezcla y finalmente se realiza el conteo de las uredosporas con el uso del microscopio y la cámara de Neubauer.



**Anexo 5.** Calibración de la metodología utilizada para el conteo de uredosporas a través del lavado. Correlación entre el número de uredosporas por mililitro de agua inicial y el número de uredosporas recuperadas en laboratorio.



**Anexo 6.** Trampas utilizadas para evaluar el salpique de las gotas de lluvia en las plantas de café en el ensayo agroforestal en CATIE, Turrialba, Costa Rica, 2 016





**Anexo 7.** Trampas utilizadas para evaluar el lavado de esporas a través de la lluvia en las plantas de café en el ensayo agroforestal en CATIE, Turrialba, Costa Rica, 2 016



**Anexo 8.** Trampas utilizadas para recuperar uredosporas depositadas sobre las hojas del café

